

**CHARAKTERISIERUNG VON PEPTIDHORMONEN
HUMANER LUNGENTUMORZELLEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Diplom Biologe

WOLFGANG LUSTER

aus Berlin

1983

**CHARAKTERISIERUNG VON PEPTIDHORMONEN
HUMANER LUNGENTUMORZELLEN**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Diplom Biologe

WOLFGANG LUSTER

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. L.M.G. Heilmeyer jr.

Korreferent: Prof. Dr. A. Ruthmann

Dekan: i.V. Prof. Dr. H. Ch. Lüttgan

Tag der mündlichen Prüfung 28.03.1983



Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie
der Ruhr-Universität Bochum

Ein Teil der hier vorliegenden Ergebnisse ist an folgenden Stellen veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung angenommen worden:

GROPP,C., SOSSTMANN,H., LUSTER,W., KALBFLEISCH,H. und HAVEMANN,K. (1981) ACTH, β -Lipotropin, β -Endorphin, β -HCG, Calcitonin, and CEA in lung tumor tissues. In: CEA und andere Tumormarker. Hrg.: UHLENBRUCK,G. und WINTZER,G., Tumor-Diagnostik-Verlag, Leonberg, 217-226

LUSTER,W., GROPP,C. und HAVEMANN,K. (1981) Kalcitonin-immunreaktives Protein, ein Tumormarker beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für innere Medizin 87, 1089-1092

LUSTER,W., GROPP,C. und HAVEMANN,K. (1981) Characterization of high molecular calcitonin-immunoreactive proteins produced by small-cell lung cancer tumor cells. Reg. Biochim. 3, 103

LUSTER,W., GROPP,C., SOSSTMANN,H., KALBFLEISCH,H. und HAVEMANN,K. (im Druck) Demonstration of immunoreactive calcitonin in sera and tissues of lung cancer patients. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 18

LUSTER,W., GROPP,C. und HAVEMANN,K. (im Druck) A specific tumormarker in small cell lung cancer: calcitonin prohormone synthesized by tumor cells. In: Verhandlungen der Deutschen Krebsgesellschaft, Fischer Verlag, Stuttgart/New York

GROPP,C., LUSTER,W. und HAVEMANN,K. (im Druck) Autoimmunoreactive big-adrenocorticotropin synthesized by lung cancer tumor cells. In: Verhandlungen der Deutschen Krebsgesellschaft, Fischer Verlag, Stuttgart/New York

LUSTER,W., GROPP,C. und HAVEMANN,K. (im Druck) Peptide hormone synthesizing lung tumor cell lines: establishment and first characterization of biosynthetic products. Suppl. Acta Endocrinol.

GROPP, C., LUSTER, W. und HAVEMANN, K. (im Druck) High molecular adrenocorticotropin and calcitonin immunoreactive proteins as biosynthetic products of small-cell lung tumors. Suppl. Acta Endocrinol.

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

cpm	-	counts per minute (Zählerimpulse pro Minute)
DTE	-	Dithiothreitol
EDTA	-	Äthylendiamintetraessigsäure
g	-	Erdbeschleunigung
h	-	Stunde
MEM	-	Minimal Essential Medium
min	-	Minute
OD	-	optische Dichte
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institute
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
TEMED	-	N,N,N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	-	Tris-hydroxymethyl-aminomethan

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Regulation der Tumorentstehung und -ausbreitung	2
1.2	Diagnose, Prognose und Therapie von Lungentumoren	6
1.3	Calcitonin als physiologisch wirksames Peptidhormon und als Tumorprotein	10
1.4	ACTH als physiologisch wirksames Peptid- hormon und als Tumorprotein	13
1.5	Problemstellung	15
2.	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Gewinnung von humanem Untersuchungsmaterial	20
2.1.1	Gewinnung von Serum	20
2.1.1.1	Hemmung der Gerinnung durch Vorlage von Natriumzitrat	20
2.1.2	Gewinnung von Tumorgewebe bzw. Tumorzellen	21
2.1.2.1	Bronchoskopische Entnahme von Tumormaterial	21
2.1.2.2	Entnahme von Knochenmark bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom	22
2.1.2.3	Entnahme von malignem Pleuraexsudat durch Pleurapunktion	22
2.1.2.4	Gewinnung von Perikardexsudat	22
2.1.2.5	Entnahme von Tumorgewebe bei kurativen oder diagnostischen Operationen	23
2.1.2.6	Postmortale Entnahme von Tumorgewebe	23
2.3.3	Aufschluß von Tumorgewebe	
2.2	Analytische Methoden	24
2.2.1	Peptidhormonbestimmungsmethoden	24
2.2.1.1	Auswertung der Peptidhormonbestimmung	24
2.2.2	Proteinbestimmungen	25
2.2.3	Bestimmung von IgG mit Hilfe der radialen Immendiffusion nach Mancini (67)	26
2.2.4	Nachweis von Antigenen in Polyacrylamid- Gradientengelen (s. 2.3.1.8) durch Immun- präzipitation in Agarosegelen	26

2.2.5	Nachweis von Calcitonin- und Adrenocorticotropin-immunreaktivem Material in Gefrierschnitten von kleinzelligem Lungentumorgewebe durch indirekte Immunfluoreszenz	27
2.2.6	Zytodiagnostik	28
2.2.7	Zählung von Zellen in Suspension	29
2.2.8	Zählung von adhärent-wachsenden Zellen in Kulturflaschen	29
2.3	Präparative Methoden	30
2.3.1	Anreicherung und Charakterisierung von Calcitonin- und ACTH-immunreaktiven Proteinen aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien von Tumorpatienten	30
2.3.1.1	Gelfiltration	30
2.3.1.2	Ionenaustauschchromatographie	31
2.3.1.3	Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose	32
2.3.1.4	Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose, Lentil-Lectin-Sepharose 4b und Wheat Germ Lectin-Sepharose	32
2.3.1.5	Affinitätschromatographie an Cibacron Blue F 3 GA (Blue Sepharose CL 6b)	33
2.3.1.6	Immunaффinitätschromatographie an Sepharose gekoppelten Anti-ACTH-Antikörpern	34
2.3.1.7	Polare Chromatographie an Silicagelen	34
2.3.1.8	Polyacrylamidgradientengelelektrophoresen zur Trennung von Calcitonin- bzw. Adrenocorticotropin-immunreaktivem Material modifiziert nach Laemmli	35
2.3.1.9	Inkubation von Serum mit Calcitonin verschiedener Herkunft	37
2.3.1.10	Inkubation von Serum mit verschiedenen ACTH-Präparationen	37
2.3.2	Dialyse von ACTH-immunreaktiven Proteinfractionen	38
2.3.3	Proteolytischer Abbau von Peptidhormon-immunreaktiven Proteinfractionen	38
2.3.4	Kultivierung von permanenten Tumorzelllinien	39
2.3.5	Partielle Reinigung von Tumorzellen aus Knochenmarkbiopsien sowie malignen Ergüssen bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom	40

2.3.6	Weichagarklonierung von Lungentumor- zellen	41
2.3.7	Lagerung von Zellkulturen	42
2.3.8	Auftauen der bei -196 °C gelagerten Zellen	43
3.	ERGEBNISSE	44
3.1	Identifizierung von Calcitonin-immunreak- tiven Proteinen aus Serum von Lungentumor- patienten	44
3.2	Nachweis von Calcitonin-immunreaktiven Pro- teinen in Lungentumorgewebe durch indirekte Immunfluoreszenz	49
3.3	Auftrennung von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen aus Tumorgewebsextrakten	53
3.4	Versuche zur weiteren Auftrennung der durch Gelfiltration gewonnenen Calcitonin-immun- reaktiven Proteine in mögliche Untereinhei- ten	53
3.4.1	Optimierung der Methode zum Nachweis von Calcitonin-immunreaktivem Protein nach elek- trophoretischer Auftrennung	56
3.4.2	Ergebnisse der elektrophoretischen Trennung der Calcitonin-immunreaktiven Proteine aus der Gelfiltration	58
3.5	Trypsinabbau von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen	61
3.6	Affinitätschromatographie an Protein A-Se- pharose und Concanavalin A-Sepharose	63
3.7	Ionenaustauschchromatographie von Calcito- nin-immunreaktivem Protein	65
3.7.1	Elektrophoretische Analyse der reversibel an DEAE-Sephacel bindenden Calcitonin-immun- reaktiven Proteinfractionen aus Seren von Lungentumorpatienten	69
3.8	Versuche zur Charakterisierung von Adreno- corticotropin-immunreaktiven Proteinen aus Seren von Patienten mit Lungentumoren	72
3.8.1	Identifizierung Adrenocorticotropin-immun- reaktiver Proteine durch Gelfiltration	73
3.8.1.1	Polare Chromatographie an Silicagel	73
3.8.1.2	Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose	74
3.8.1.3	Affinitätschromatographie an Sepharose- Blau	76

3.8.1.4	Molekulargewichtsbestimmung ACTH-immun-reaktiver Proteinfraktionen durch Gelfiltration	76
3.9	Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen in Gefrierschnitten von kleinzelligem Lungentumorgewebe	80
3.10	Gelfiltrationen der ACTH-immunreaktiven Proteine aus Tumorextrakten	81
3.11	Charakterisierung von ACTH-immunreaktiven Proteinen als Autoantigen im Serum von Patienten mit kleinzelligen Lungentumoren	84
3.12	Immunaффinitätschromatographie von ACTH-Immunkomplexen an Anti-ACTH-Sepharose	87
3.13	Zusammenfassung der Charakterisierung der in den Seren von Lungentumorkranken zirkulierenden, bzw. aus Tumorgewebe gewonnenen Adrenocorticotropin- und Calcitonin-immunreaktiven Proteine	91
3.14	Etablierung von permanenten Tumorzelllinien	93
3.14.1	Versuche zur Etablierung von Tumorzelllinien in nackten Mäusen und Ratten	95
3.14.2	Etablierung von permanenten Tumorzelllinien aus chirurgisch gewonnenem Material	97
3.14.3	Etablierung von permanenten Tumorzelllinien aus malignen Ergüssen	104
3.14.4	Etablierung von permanenten Tumorzelllinien aus Knochenmarkbiopsien	111
3.15	Permanente Tumorzelllinien als Ausgangsmaterial für Untersuchungen zur Biosynthese von Peptidhormon-immunreaktiven Proteinen	112
3.16	Calcitonin- und Adrenocorticotropin-Produktion durch Tumorzelllinien während des Wachstums	119
3.16.1	Gelfiltration von durch Tumorzelllinien synthetisierten Calcitonin- und Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen	121
3.16.2	SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese von Calcitonin-immunreaktivem Protein aus Lungentumorzelllinien	126
4.	DISKUSSION	128
4.1	Charakterisierung von Calcitonin-immunreaktivem Protein in Serum und Gewebe von Lungentumorkranken	128

4.2	Charakterisierung von Adrenocorticotropin-immunreaktivem Protein in Serum und Gewebe von Lungentumorpatienten	134
4.3	Die Bedeutung von ACTH- β -Lipotropin-immunreaktiven Proteinen als Autoantigen im Serum von Patienten mit kleinzelligen Lungentumoren	138
4.4	Untersuchungen an Adrenocorticotropin- und Calcitonin-Immunreaktivität synthetisierenden Tumorzelllinien	142
4.5	Charakterisierung der von Lungentumorzelllinien synthetisierten und ins Kulturmedium abgegebenen Calcitonin-immunreaktiven und Adrenocorticotropin- β -Lipotropin-immunreaktiven Proteine	145
4.6	Bedeutung der vorgestellten Daten für Diagnose und Pathogenese von Lungentumoren	151
5.	ZUSAMMENFASSUNG	154
6.	LITERATUR	155

1. EINLEITUNG

Tumorerkrankungen werden hervorgerufen durch pathologische, d.h. den physiologischen Regulationsmechanismen entzogene Veränderungen der teilungsfähigen Zellen. Sie treten nicht nur beim Menschen und den höheren Tieren auf, sondern auch bei Insekten und Pflanzen (1). Sie stellen zwar einerseits Erkrankungen ganz eigener Art dar, die sich morpho- und pathophysiologisch von allen anderen Krankheitsbildern abgrenzen, andererseits zeigen die unterschiedlichen Tumorarten so große Abweichungen, daß eine allgemeine Definition, die allen Tumorformen gerecht würde, nicht möglich ist. Als Tumor wird heute eine abnorme Gewebsmasse bezeichnet, die durch eine autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Diese Merkmale grenzen einen Tumor von einer Entzündung, einer Regeneration, einer parasitären Erkrankung und einer Hyperplasie ab. Beim Tumor löst ein bestimmter Reiz die Zellproliferation aus, die später autonom bleibt und keiner hemmenden Wirkung von Seiten des Organismus mehr unterliegt (2).

Im Rahmen der Arbeiten zur Aufschlüsselung dieses biologischen Phänomens sind zwei Forschungsschwerpunkte zu verzeichnen: einerseits die klinisch ausgerichtete Forschung, die Diagnose und Therapie zum Inhalt hat und andererseits die naturwissenschaftliche Forschung, die an der Erkennung von pathogenetischen Prinzipien interessiert ist (3, 4, 5, 6, 7). Die naturwissenschaftliche Krebsforschung hat zahlreiche Modelle zur Tumorentstehung entwickelt, deren Ergebnisse jedoch in den wenigsten Fällen auf den Menschen übertragbar waren (8, 9). Im Forschungsprojekt, in dessen Rahmen

die vorliegende Arbeit entstand, sollten die molekularen Zusammenhänge eines in der Klinik beschriebenen Phänomens - das Auftreten von Peptidhormonen im Serum von Lungentumorpatienten - direkt im humanen System untersucht werden.

Bevor jedoch auf die detaillierte Problemstellung eingegangen wird, sollen zunächst die essentiellen Stoffwechselabläufe und ihre Regulationsmechanismen, die Tumorentstehung und -ausprägung beeinflussen, zusammengefaßt werden.

1.1 Regulation der Tumorentstehung und -ausbreitung

Grundlegend anerkannt sind heute zwei prinzipielle Möglichkeiten zur Entstehung von Tumoren auf der Ebene der einzelnen Zelle:

1. Die primären Veränderungen der Zelle finden auf der Ebene der Proteinbiosynthese statt.
2. Ein Tumor hat seinen Ursprung in der Veränderung der genetischen Substanz einer Zelle.

Hieraus folgt, daß sehr unterschiedliche Reize zur Entstehung von Tumoren führen können (2, 10) und daß es sich beim Krebs um eine einheitliche Erkrankung handelt, bei der die einmal transformierten Zellen ihre Eigenschaften auf ihre Nachkommen vererben (11). Für beide Möglichkeiten der Transformation gibt es bisher zahlreiche unterstützende experimentelle Befunde (12, 13). Der Gegensatz zwischen den beiden Theorien ist jedoch nur ein scheinbarer Gegensatz, denn eine Veränderung im Cytoplasma der Zelle kann Modifikationen der DNS zur Folge haben wie auch direkte Einwirkungen auf die DNS zur Mutation führen können (2).

Über die Modelle zur malignen Transformation von Zellen hinaus ist die Frage nach dem histologischen Aufbau eines Tumors von großem Interesse: Entsteht oder besteht ein Tumor aus einer einzigen oder mehreren unterschiedlichen Zellen?

Für die Entstehung eines Tumors aus einer Zelle konnte bei einigen malignen Entartungen der eindeutige Beweis eines monoklonalen Ursprungs erbracht werden (14). Plasmocytome zum Beispiel synthetisieren Immunglobuline. Bei diesen Tumoren läßt sich zeigen, daß die individualspezifischen Tumoren nur eine leichte und/oder eine schwere Kette des Immunglobulins sezernieren. Dies wiederum impliziert, daß sie sich von einer einzigen Zelle ableiten. Trotz dieses für viele, wenn nicht sogar für alle Tumoren zutreffenden monoklonalen Ursprunges kommt es im Laufe der Tumorgenese zu morphologischer und biochemischer Heterogenität (15, 16). Tumorgewebe unterliegt einem ständig wechselnden selektiven Druck durch seine Umgebung. Tumorzellen haben häufig eine kürzere Generationszeit, so daß die Möglichkeiten zur Mutation größer sind als bei normalen Zellen. Die schlechte Durchblutung und dadurch die Ausbildung von Nekrosen im Inneren von solide wachsenden Tumoren ergeben einen starken Selektionsvorteil für Zellen, die auch anaerob wachsen können. Häufig sind in Tumorzellen auch sogenannte E-Gruppen-Chromosome vermehrt, und es kommt zu einer vermehrten Synthese von Thymidin-Kinase. Dadurch können durch Alterungsprozesse bedingte Letalmutationen verhindert werden, was eine Erklärung für die unbegrenzte Teilungsfähigkeit von Tumorzellen bieten könnte (2).

Ein weiterer Problemkreis, zu dem zur Zeit sehr widersprüchliche Beobachtungen vorliegen, ist der Einfluß des Immunsystems auf die Tumorentstehung. Im menschlichen Körper entstehen wahrscheinlich ständig transformierte Zellen, die vom Immunsystem als entartet erkannt und vernichtet werden. Befunde an immunsuppressiv behandelten Patienten, bei denen eine erhöhte Tumorfrequenz beobachtet worden ist, sprechen dafür, daß Defekte im Immunsystem es den transformierten Zellen ermöglichen, ungestört zu proliferieren und daß diese nach dem Erreichen einer gewissen kritischen Tumormasse auch durch ein wiederhergestelltes Immunsystem nicht mehr zu kontrollieren sind. Dieser Effekt wird möglicherweise dadurch verstärkt, daß Tumorzellen selbst immunsuppressive Substanzen synthetisieren (11, 17).

Unabhängig von diesen grundlegenden Überlegungen werden Tumoren in zwei prognostisch unterschiedliche Gruppen unterteilt: In die benignen und die malignen Tumoren. Ein benigner Tumor wächst expansiv und verdrängt dabei umliegendes Körpergewebe. Er drängt also das umliegende Gewebe bzw. die umliegenden Organe beiseite, ohne in das Gewebe einzudringen.

Ein primär gleiches, sekundär jedoch völlig anderes Verhalten zeigen maligne Tumoren: Bei ihnen beginnt nach einer mehr oder weniger kurzen Phase expansiven Wachstums ein invasives Wachstum, das zu Lokal- und Fernmetastasen führt (11). Die Fähigkeit zur Zerstörung bzw. zum Eindringen in das umliegende Gewebe von malignen Tumorzellen wird durch Befunde erklärt, die eine Absonderung zahlreicher Enzyme (Kollagenasen, Hyaluronidasen) beschreiben (18). Desweiteren ist die Ex-

ekretion von für gesunde Zellen zytotoxischen Substanzen nachgewiesen worden sowie die Synthese und Exkretion von Wachstumsfaktoren (19, 20). An den Grenzen des Tumors werden Fusionen zwischen Tumorzellen und nicht transformierten Gewebszellen sowie wechselseitige Phagocytose beobachtet (21). Eine weitere Voraussetzung, die es Tumorzellen ermöglicht, Fernmetastasen zu setzen, ist ihre erhöhte Eigenbeweglichkeit zusammen mit der Fähigkeit, Gefäßwände zu durchdringen.

Trotz zahlreicher Befunde über die biochemischen Fähigkeiten, die es Tumorzellen ermöglichen, invasiv zu wachsen, ist bislang nur wenig bekannt über die Mechanismen, welche den Übergang vom expansiven zum invasiven Wachstum regulieren. Es ist jedoch gelungen, aufgrund morphologischer Kriterien solche Übergänge zu beschreiben (22, 23). Da der derzeitige Stand der Entwicklung es nicht zuläßt, in die fortgeschrittene Tumorgenese einzugreifen, ist es für den Patienten von entscheidender Bedeutung, maligne Transformationen so früh wie möglich zu erkennen. Zahlreiche Studien, in denen Tumorstadien und Therapieerfolg verglichen wurden (24, 25), haben gezeigt, von welcher großen Bedeutung eine Früherkennung bei einem Tumor ist, besonders wenn er eine extrem kurze Symptombdauer (Zeitspanne vom Auftreten der ersten Beschwerden bis zur Diagnosestellung) hat (26). Es erhebt sich die Frage, auf welche Weise eine solche Frühdiagnostik durchgeführt werden kann, wenn die cytologischen Methoden, wie sie bei leicht zugänglichen Karzinomen oft erfolgreich eingesetzt werden (22), weggelassen müssen. Die

Konsequenz, die hieraus folgt, ist die Erfassung der biosynthetischen Fähigkeiten eines schwer zugänglichen Tumors in einem leicht zugänglichen Medium, also einer Körperflüssigkeit (27). In der vorliegenden Arbeit wird am Beispiel der Lungentumoren eine derartige Fragestellung verfolgt werden.

1.2 Diagnose, Prognose und Therapie von Lungentumoren

Histologisch werden die Lungentumoren in 4 z.T. histologisch noch weiter unterteilte Gruppen differenziert: großzellige (10-15 %), kleinzellige (15-40 %), Plattenepithel- (35-50 %) und Adenokarzinome (15-30 %) (28, 29]. Diagnostiziert werden die Lungentumoren im allgemeinen erst nach dem Auftreten der ersten Beschwerden anhand von klinischen Parametern. Die Symptombdauer ist extrem kurz. Beim Plattenepithelkarzinom beträgt diese zur Zeit 8 Monate, beim kleinzelligen Bronchialkarzinom nur drei Monate (26). Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, das sich unter anderem auch durch ein schnelles Wachstum mit Tumorverdoppelungszeiten von etwa 30-40 Tagen von den nichtkleinzelligen Lungentumoren mit Tumorverdoppelungszeiten von 60-80 Tagen unterscheidet, konnten Eagan et al. (30) in 84 % eine Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose feststellen. Durch diese frühe Tendenz zur Metastasierung sind kleinzellige Bronchialkarzinome nicht mehr operabel. Ebenso wurde die Erfolglosigkeit der Strahlentherapie in zahlreichen Untersuchungen belegt (31). Lediglich durch Polychemo-, in Kombi-

nation mit einer Strahlentherapie ist es möglich, die Prognose von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom zu verbessern (26). Der Erfolg einer adjuvanten Chemotherapie nach kurativer Operation von nichtkleinzelligen Lungentumoren konnte bislang noch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Alleinige Chemotherapie von nichtkleinzelligen Karzinomen erbrachte keine Verbesserung der Prognose (32).

Alle bisher gesicherten Erkenntnisse zur Diagnose, Prognose und Therapie von Lungentumoren sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Betrachtet man die Prognose einer Lungentumorerkrankung - unabhängig von der Therapie - ist sie unmittelbar abhängig von der Tumorausbreitung, d.h. vom Grad der Metastasierung. Diese Metastasenhäufigkeit führt zurück auf den Zeitpunkt der Diagnose. Erste Hinweise auf die Möglichkeit zur Frühdiagnostik von Lungentumoren wurden bereits gegeben: Bei Patienten mit Lungentumoren sind in den vergangenen Jahren paraneoplastische Syndrome verursacht durch eine ektope Hormonproduktion beschrieben worden. Obwohl paraneoplastische Syndrome bei Lungentumorpatienten relativ selten sind (3-8 %), konnten zahlreiche Untersuchungen eine deutlich höhere Inzidenz von durch immunologische Methoden nachweisbaren pathologisch erhöhten Serumspiegeln verschiedener Peptidhormone ohne Ausprägung eines paraneoplastischen Syndroms belegen. Die Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bei Lungentumoren im Serum nachgewiesenen Hormone. Alle Autoren beschrieben die Assoziation der Hormone mit dem kleinzelligen Lungenkarzinom, während die Angaben die anderen Histo-

Tab. 1: Charakteristika von Lungentumoren verschiedener Histologien

	kleinzelliges Bronchialkarz.	Plattenepi- thelkarzinom	großzelliges Bronchialkarz.	Adeno- karzinom
Diagnose	Klinische Parameter, Röntgenbefunde, Ultraschall, Computertomographie, Bronchoskopie, meist erst nach Auftreten klinischer Symptome oder Zufallsbefunde			
Symptombdauer vor Diagnose	ca. 3 Monate	ca. 8 Monate	ca. 8 Monate	länger als 8 Monate
Basalzellhyperplasie und Plattenepithelmetaplasie als Vorstufe eines carcinoma in situ beschrieben	ja	ja	nein	nein
Tumorverdopplungszeiten in vivo	30-40 Tage	60-80 Tage	60-80 Tage	60-80 Tage
Tumorklassifikation	zentral hilus- nah sowie peri- pher	zentral hilus- nah und peri- pher	zentral hilusnah	peripher
Mittlere Überlebenszeit ohne Therapie	1,4-3,4 Monate	länger als 8 Monate		
5-Jahresüberlebenszeit nach Operation	0,6-1,4%	25-30%	unter 10%	30-46 %
regionale Lymphknotenmetastasen	47%	17%	60%	46%
Häufigkeit von nachweisbaren lymphogenen und hämatogenen Fernmetastasen	80-100%	50-60%	50%	bis zu 80 %
klinisch nicht faßbare Fernmetastasen; nach Operation, nach Autopsiebefund	70% in 50% Knochenmarks- metastasen	33%	nicht bekannt	43%
Nekrosen der Tumormasse	selten	häufig	selten	selten
Deletion Chromosom 3p	ja	nein	nein	nein
bei Rauchern häufiger als bei Nichtrauchern	ja	ja	nein	nein
Verbesserung der Prognose durch Strahlentherapie	fraglich	fraglich	fraglich	fraglich
Verbesserung der Prognose durch Polychemotherapie und Strahlentherapie	ja, bis zu 90% Remission, mittlere Überlebenszeit 11 Monate	fraglich	fraglich	fraglich
2-Jahresüberlebensrate je nach Ausbreitungsstadium	4-6%	12-47%	13-43%	8-46%

Tab. 2: Immunologisch nachgewiesene Hormone im Plasma
und Serum von Lungentumorpatienten

Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) (33, 34)
Antidiuretisches Hormon (ADH) Vasopressin (35)
Calcitonin (36, 37)
Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) (38)
Choriongonadotropin (HCG) (34)
Wachstumshormon (HGH) (27)
Prolaktin (39)
Luteinisierendes Hormon (LH) (27)
Melanocyten-stimulierendes Hormon (MSH) (40)
Parathormon (PTH) (27)
Serotonin (41)
Gastrin (42)

logien betreffend unterschiedlich waren. Aus der Diskrepanz zwischen der relativ großen Häufigkeit des Auftretens von pathologisch erhöhten, immunologisch nachweisbaren Peptidhormonspiegeln im Serum von Lungentumorpatienten und der relativ geringen Inzidenz von paraneoplastischen Syndromen bei diesen Erkrankungen wurde schon früh der Schluß gezogen, daß es sich bei diesen Peptiden um biologisch inaktive und damit biochemisch sich von den physiologischen Hormonen unterscheidende Proteine handeln könnte. Hierzu wurden auch Ergebnisse aus den Untersuchungen anderer Tumoren herangezogen. Besonders für endokrine Karzinome, wie zum Beispiel für das C-Zellkarzinom der Schilddrüse, konnte ge-

zeigt werden, daß die von C-Zelltumoren synthetisierten Calcitonin-immunreaktiven Proteine ein höheres Molekulargewicht besaßen als das physiologische Hormon (43). Aus den genannten Gründen äußerten zahlreiche Autoren die Vermutung, daß es möglich sein könnte, die bei Patienten mit Lungentumoren pathologisch erhöhten Peptidhormonkonzentrationen im Serum als Mittel zur Frühdiagnose einzusetzen (44, 45). Luster et al. (37) untersuchten das Auftreten von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen im Serum von 198 Patienten mit nach den WHO-Richtlinien klassifizierten histologisch gesicherten Bronchialkarzinomen. Es konnte eine deutliche Korrelation zwischen kleinzelligen Lungentumoren und pathologisch erhöhten Calcitoninspiegeln im Serum (54 %) gezeigt werden (Abb. 1). Untersuchungen von Gropp et al. (34) erbrachten für adrenocorticotropes Hormon einen ähnlichen Befund, wobei pathologisch erhöhte ACTH-Konzentrationen im Serum von Patienten mit kleinzelligen (36 %) und großzelligen Lungentumoren (26 %) nachgewiesen werden konnten (Abb. 1). Für das ACTH wurden zusätzlich Hinweise einer autoantigenen Wirkung erbracht (46). Aus diesen labordiagnostischen Daten ließ sich auf eine besondere Bedeutung der Peptidhormone, Calcitonin und ACTH bei klein- und großzelligen Lungentumoren schließen.

1.3 Calcitonin als physiologisch wirksames Peptidhormon und als Tumorprotein

Calcitonin wurde erstmals 1961 von Copp et al. (47) beschrieben. Es handelt sich um ein Polypeptid mit einem Mo-

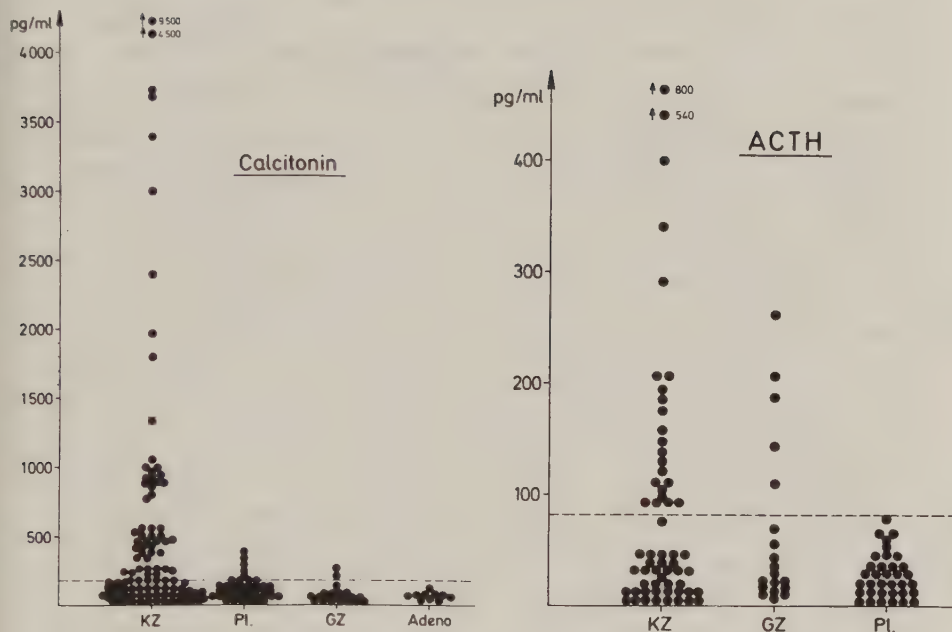


Abb. 1. Calcitonin- bzw. ACTH-Konzentrationen im Serum von Patienten mit histologisch gesichertem Bronchialkarzinom zum Zeitpunkt der Diagnose.

Calcitonin- bzw. ACTH wurde radioimmunologisch mit Antikörpern gegen humanes physiologisches Calcitonin bzw. ACTH bestimmt.

KZ - kleinzelliges Bronchialkarzinom

GZ - großzelliges Bronchialkarzinom

Pl. - Plattenepithelkarzinom

Adeno - Adenokarzinom

Der Grenzwert (----) wurde anhand der Untersuchung von 100 gesunden Personen ermittelt.

lekulargewicht von etwa 3500 Dalton bestehend aus 32 Aminosäuren mit einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten der Position 1 und 7 (48). Calcitonin wird von den sogenannten C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert und reguliert zusammen mit dem Parathormon den Calciumblutspiegel beim Menschen (48, 49). Aufgrund der komplexen Wirkungsweise des Calcitonins sind bis heute praktikable physiologische Tests dieses Hor-

mons nicht beschrieben worden, so daß es stets mit Hilfe immunologischer Methoden bestimmt wird (50, 51).

Pathologisch erhöhte Calcitoninkonzentrationen im humanen Serum über 180 pg/ml wurden bei Patienten mit Niereninsuffizienz, Hypernephromen sowie bei Lungentumoren und beim C-Zellkarzinom der Schilddrüse gefunden. Lediglich bei den letzteren Tumoren treten extrem erhöhte Calcitoninmengen über 500 pg/ml Serum auf. Bei Patienten mit C-Zellkarzinomen der Schilddrüse, einem relativ langsam wachsenden, klinisch unauffälligen Tumor, mit einer Neigung zur frühen Metastasenbildung wurden als erste Tumorerkrankung diese pathologischen Calcitoninkonzentrationen im Serum nachgewiesen. Mit Hilfe immunologischer Bestimmungstechniken unter Verwendung von Antikörpern gegen physiologisches Humancalcitonin konnten im Serum dieser Patienten mehrere Calcitonin-immunreaktive Proteine mit Molekulargewichten zwischen 3.400 und 12.000 Dalton beschrieben werden (52, 53).

Dieses Ergebnis ist als Hinweis auf die Sekretion tumorspezifischer Calcitoninmoleküle zu werten. Die Bestimmung C-Zellkarzinom-spezifischer Proteine ist jedoch bedeutungslos, da bereits im präklinischen Tumorstadium mit Antiseren gegen physiologisches Calcitonin deutlich erhöhte Calcitoninkonzentrationen gemessen werden können.

Anders ist die Situation beim Bronchialkarzinom. Zwar können auch hier extrem hohe Calcitoninkonzentrationen im Serum nachgewiesen werden, jedoch ist dies, wie in Abb. 1 dargestellt, längst nicht die Regel, so daß hier bislang ein großer Teil der Patienten einer Frühdiagnostik im präklinischen Stadium entgeht (37, 54).

1.4 ACTH als physiologisch wirksames Peptidhormon und als Tumorprotein

Adrenocorticotropes Hormon wird physiologisch aus der Adenohypophyse unter dem Einfluß des vom Hypothalamus ausgeschütteten Corticotropin releasing-factor in die Blutzirkulation abgegeben. Zielorgan von ACTH ist die Nebennierenrinde. Dort stimuliert es die Ausschüttung von Glukocorticoiden. Daneben besitzt ACTH in starkem Maße eine extra-adrenale Wirkung, d.h. es wirkt auch unmittelbar auf nicht endokrine Zielorgane ein. Durch die Arbeiten von Nakanishi (55), Mains und Eiper (56, 57) und Takahashi (50) gilt es heute als allgemein akzeptiert, daß ACTH zusammen mit dem β -Lipotropin aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül durch proteolytische Prozesse gebildet wird. Durch weitere Degradation entstehen aus diesen Proteinen α -MSH (Melanocyten-stimulierendes Hormon), CLIP (58) (Corticotropin like intermediate lobe peptide), γ -Lipotropin, β -MSH und β -Endorphin (59). Die Abb. 2 veranschaulicht die heutige Vorstellung über die Biosynthese des ACTH- β -Lipotropin-Vorläufermoleküls.

Pathologische Konzentrationen von physiologischem ACTH im Serum führen klassischerweise über eine gesteigerte Cortisolausschüttung zum sogenannten Cushing-Syndrom. Cushing-Syndrome treten häufig im Zusammenhang mit Nebennierentumoren und Hypophysentumoren auf. Beim Bronchialkarzinom kommt es dahingegen zum sogenannten ektopen ACTH-Syndrom, das sich klinisch deutlich vom Cushing-Syndrom abgrenzen läßt. Tanaka et al. (60) beschrieben 1978 hochmolekulare

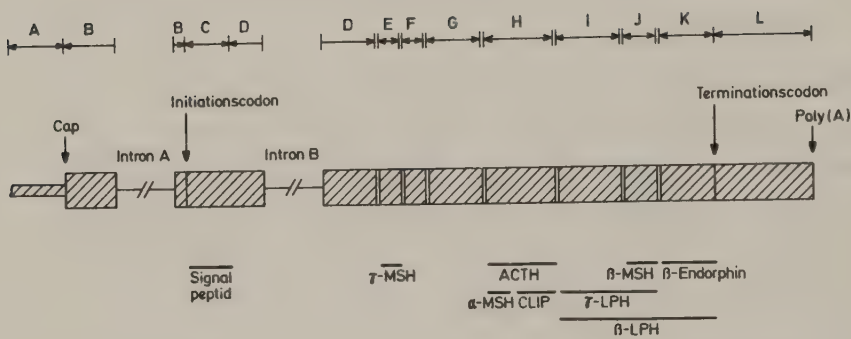


Abb. 2 Modell der Biosynthese von ACTH und der mit diesem Hormon aus dem gemeinsamen Vorläufermolekül abgeleiteten Hormone und Peptide (nach Takahashi et al. (58)).

Das m-RNS kodierende Segment (dicke Blöcke) und die vorangehende Sequenz sind in 12 strukturelle Regionen unterteilt.

MSH - Melanocyten stimulierendes Hormon

CLIP - corticotropin like intermediate lobe peptide

LPH - Lipotropin

Adrenocorticotropin-immunreaktive Proteine im Serum und Gewebe von Patienten mit Hypophysentumoren, bei denen es sich möglicherweise um ACTH-Vorläufermoleküle handeln könnte (s. Abb. 2). Da bei Lungentumoren nur in seltenen Fällen ACTH-Syndrome ausgeprägt werden, obwohl durch immunologische Messung wesentlich häufiger pathologisch erhöhte ACTH-Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden, lag die Vermutung nahe, daß beim Bronchialkarzinom physiologisch inaktive ACTH-Vorstufen oder defekte Moleküle gebildet werden. Diese Vorstellung unterstützende Hinweise erbrachten Untersuchungen von Gropp et al. (34), die neben dem ACTH pathologisch erhöhte β-Endorphinkonzentration im Serum von Patienten mit kleinzelligen und großzelligen Lungentumoren nachweisen konnten.

1.5 Problemstellung

Aus den zu Beginn der vorliegenden Arbeit vorhandenen Untersuchungsergebnissen für die Lungentumoren kann das folgende Bild erstellt werden:

Lungentumoren zeichnen sich klinisch durch einen zumeist schnellen Verlauf aus, da die Diagnose in der Regel erst nach Auftreten der ersten Beschwerden anhand klinischer Parameter gestellt werden kann. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch zumeist bereits ein hoher Metastasierungsgrad erreicht. Die danach einsetzenden Therapieversuche sind selten von langfristigem Erfolg gekrönt, so daß das wichtigste Ziel die Frühdiagnostik dieses Tumors sein muß. Parallel dazu sollte eine Verlaufskontrolle die Therapie so effektiv wie möglich gestalten. Für kleinzellige Lungentumoren treffen diese Gegebenheiten in besonderem Maße zu, da es sich hierbei um die aggressivste Bronchialkarzinomform handelt.

Paraneoplastische Syndrome haben die Suche nach einem serologischen Tumormarker zur Frühdiagnostik auf die Peptidhormone gelenkt. Hierbei wurde im besonderen die Korrelation von hohen Calcitonin- und ACTH-Konzentrationen im Serum mit dem Vorhandensein von kleinzelligen Bronchialkarzinomen auffällig. Da diese Peptidhormone stets immunologisch und nicht funktionell nachgewiesen wurden, ergab sich eine erhebliche Diskrepanz zwischen paraneoplastischen Syndromen und erhöhten Hormonspiegeln. Parallel dazu wurden in Tumoren, die die Calcitonin- bzw. ACTH-produzierenden endokrinen Drüsen betrafen, biochemische Untersuchungen der immunreaktiven Mo-

leküle durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurden hochmolekulare wahrscheinlich physiologisch inaktive Molekülformen beschrieben. Diese Befunde führten zur Hypothese, daß Bronchialkarzinomzellen, insbesondere kleinzellige Bronchialkarzinomzellen, tumorspezifische Calcitonin- und ACTH-Moleküle synthetisieren, die für eine Frühdiagnostik und eine Therapiekontrolle geeignet sein könnten. Immunologisch mit Hilfe von Antikörpern gegen die physiologischen Proteine bestimmte Calcitonin- und ACTH-Konzentrationen im Serum von Lungentumorpatienten können bereits zur Therapiekontrolle eingesetzt werden (34, 37). Für Patienten mit hohen Hormonkonzentrationen bei Diagnosestellung scheinen diese Ergebnisse durchaus befriedigend. Es ist jedoch zu bedenken, daß nur ein Teil der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und nur seltene Fälle mit nichtkleinzelligen Lungentumoren derart hohe Konzentrationen an Peptidhormonen exprimieren. Bei den restlichen Patienten liegen diese Hormonspiegel so stark im Bereich der physiologischen Hormonkonzentrationen, daß signifikante Veränderungen nicht mehr erfaßt werden können. Der Versuch einer Frühdiagnose durch die Bestimmung von ACTH bzw. Calcitonin scheiterte bisher ebenfalls daran, daß die physiologischen Hormone von möglichen tumorspezifischen Proteinen immunologisch nicht unterschieden werden können. So heben sich anfänglich noch niedrige Konzentrationen von tumorspezifischen Hormonen nicht aus dem Niveau der bei gesunden Personen vorhandenen Hormonkonzentrationen heraus. Wolfson et al. (61) konnten

zwar in einer prospektiven Untersuchung bei 110 Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen bei 5 von 20 Patienten mit erhöhten Konzentrationen an ACTH im Serum nach 2 Jahren die Entwicklung eines Lungenkarzinoms beobachten, wohingegen nur bei 2 von 81 Patienten mit physiologischen ACTH-Konzentrationen im Serum im selben Zeitraum die Entwicklung eines Lungenkarzinoms beobachtet wurde. Jedoch können solche Ergebnisse lediglich als Hinweis darauf gewertet werden, wie wichtig und sinnvoll die Suche nach einem spezifischen Tumorphosphoprotein, das sich immunologisch vom physiologischen Hormon unterscheiden läßt, ist. In der vorliegenden Arbeit sollten die Voraussetzungen zur Entwicklung solcher spezifischer immunologischer Tests für die Calcitonin- bzw. ACTH-immunreaktiven Proteine geschaffen werden. Dazu waren im einzelnen folgende Punkte zu klären:

1. Handelt es sich bei den im Serum von Lungentumorphosphoproteinpatienten zirkulierenden Calcitonin-immunreaktiven Proteinen um physiologisches Calcitonin oder um ein oder mehrere Proteine, die sich biochemisch von diesem unterscheiden?
2. Handelt es sich um ein einheitliches Protein oder Proteinhomomere, welches vom Tumor synthetisiert wird, oder treten starke, von der Histologie des Tumors unabhängige, individualspezifisch von Patient zu Patient schwankende molekulare Formen auf?
3. Wird Calcitonin-immunreaktives Protein vom Tumor synthetisiert oder erfolgt die Synthese reaktiv auf das Krankheitsgeschehen am physiologischen Syntheseort?
4. Besteht tatsächlich ein derart enger Zusammenhang zwischen der Stoffwechselaktivität des Tumors und den Konzentrationen

an Calcitonin im Serum wie es frühere Untersuchungen vermuten lassen?

Für das ACTH sollten prinzipiell die gleichen Fragen beantwortet werden. Es sollte darüberhinaus untersucht werden, inwieweit sich aus früheren Arbeiten ergebene Befunde über eine autoantigene Rolle dieses Proteins in Seren von Patienten mit Lungentumoren bestätigen und charakterisieren lassen, sodaß die Immunkomplexe möglicherweise zur Frühdiagnostik, vor allem aber wohl zur Therapiekontrolle herangezogen werden könnten.

Zur Klärung aller aufgeworfenen Probleme sollte zunächst versucht werden, aus einer größeren Anzahl von Patientenseren und Tumorgewebe die Calcitonin- und ACTH-immunreaktiven Proteine anzureichern und zu charakterisieren. Da jedoch hierfür die kontinuierliche Bereitstellung von ausreichenden Mengen an Humanserum und Gewebematerial schwierig ist, sollte auch versucht werden, permanente Tumorzelllinien zu etablieren. Hierdurch könnte gleichzeitig die Frage, ob die in der Zirkulation auftretenden Peptidhormone tatsächlich vom Tumor gebildet werden oder doch am physiologischen Syntheseort entstehen und im Tumor lediglich gespeichert werden, endgültig eine Antwort finden. Mit Hilfe der Zellkulturen könnte zusätzlich geklärt werden, inwieweit die Biosynthese von ACTH- und Calcitonin-immunreaktiven Molekülen für kleinzellige Bronchialtumoren charakteristisch ist oder ein allgemeines Phänomen der Lungentumoren darstellt. Solche Untersuchungen könnten einen Beitrag zu der zur Zeit in der Literatur geführten Diskussion zum phylogenetischen Ursprung der Lungentumoren leisten (62).

Es wird gezeigt werden, daß Lungentumoren in vivo und in vitro ein tumorspezifisches Calcitonin-immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 17.000 Dalton sekretieren können, das in Diagnostik und Verlaufskontrolle von Lungentumorerkrankungen Bedeutung haben könnte. Dieselben Zellen synthetisieren ACTH-immunreaktives Protein, welches durch seine autoantigene Wirkung eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Lungentumoren spielen könnte.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung von humanem Untersuchungsmaterial

2.1.1 Gewinnung von Serum

Die Blutentnahme zur Gewinnung von Serum bzw. Plasma erfolgte ausschließlich mit sterilen Einmalspritzen und mit Einmalnadeln 0,9 x 70 mm überwiegend aus der Cubital-Vene des linken Armes. Es wurde Blut von 240 Patienten mit nach den WHO-Klassifikationen (29) histologisch gesicherten Bronchialkarzinomen und von 52 gesunden Kontrollpersonen entnommen. Bei 190 Patienten war ein kleinzelliges, bei 30 Patienten ein großzelliges Bronchialkarzinom und bei 20 Patienten ein Plattenepithelkarzinom histologisch differentialdiagnostiziert worden. Blutentnahmen erfolgten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei allen Patienten, bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom wurde zusätzlich vor jedem Therapiezyklus der cytostatischen Behandlung eine Serumprobe entnommen.

Blut für Serumproben wurde bis zur vollständigen Gerinnung zwei Stunden bei 4 °C stehengelassen und dann 10 min. bei 4 °C mit 800 xg abzentrifugiert. Seren wurden in 0,5 ml und in 1 ml Portionen abgefüllt und bis zur Aufarbeitung bei -70 °C gelagert.

2.1.1.1 Hemmung der Gerinnung durch Vorlage von Natriumzitrat

Zur Gewinnung von Plasma aus humanem Blut und um eine Verklumpung der Zellen in malignen Ergüssen durch Fibrin zu

verhindern, wurde in die jeweiligen Abnahmegefäße 10 % des Gefäßvolumens einer 3,8 %igen Natriumzitratlösung (Merck, Darmstadt) vorgelegt. Im Anschluß an die Abnahme wurde das Gefäß zur Vermeidung von Konzentrationsgradienten zweimal langsam umgeschwenkt. Ca^{++} -bindende Anionen greifen auf mehreren Ebenen in die Gerinnungskaskade ein und verhindern über die Hemmung Ca^{++} -abhängiger Schritte die für die Gerinnung notwendige Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin (63). Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Zellen 10 min. bei 4 °C mit 800 xg abzentrifugiert.

2.1.2 Gewinnung von Tumorgewebe bzw. Tumorzellen

Tumormaterial für die biochemischen Untersuchungen, für die Immunfluoreszenz und für die Etablierung von permanenten Zelllinien wurde bei diagnostischen Bronchoskopien, diagnostischen Beckenkammstanzen, therapeutischen Pleuraexsudatentnahmen, therapeutischen Perikardexsudatentnahmen, kurativen oder diagnostischen Operationen sowie postmortal entnommen.

2.1.2.1 Bronchoskopische Entnahme von Tumormaterial

Ungefähr 1 mm³ große Tumorgewebsstücke wurden unter optischer Kontrolle durch ein Kaltlichtbronchoskop (CLE-3 Olympus, Tokio) als Zangenbiopsie durch die Trachea hindurch entnommen und sofort in MEM-Dulbecco-Medium (Boehringer, Mannheim) überführt und wie unter 2.3.5 beschrieben weiterverarbeitet.

2.1.2.2 Entnahme von Knochenmark bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom

Knochenmark wurde mit einer sterilen Yamshidi-Nadel (Braun, Melsungen) in 10 ml Einmalspritzen nach Vorlage von Natriumzitratlösung aus der Spina iliaca aspiriert. Das aspirierte Knochenmark wurde in sterile 15 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen umgefüllt und wie unter 2.3.6 beschrieben weiterverarbeitet.

2.1.2.3 Entnahme von malignem Pleuraexsudat durch Pleurapunktion

Pleuraexsudat wurde durch Punktion der im Pleuraraum befindlichen Flüssigkeitsansammlung in 20 ml-Einmalspitzen nach Vorlage von Natriumzitratlösung entnommen. Die Entnahme wurde unter Ultraschallkontrolle durchgeführt. Das Pleuraexsudat wurde in sterile 15 ml- bzw. 50 ml-Kunststoffzentrifugenröhrchen überführt und wie unter 2.3.6 beschrieben weiterverarbeitet.

2.1.2.4 Gewinnung von Perikardexsudat

Mit Hilfe einer Schirmbilddurchleuchtungskontrolle wurde während therapeutischer Perikardpunktionen Perikardexsudat nach Vorlage von Natriumzitratlösung mit Hilfe eines Rotanders (Braun, Melsungen) in Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Das Exsudat wurde dann wie unter 2.3.6 beschrieben weiterverarbeitet.

2.1.2.5 Entnahme von Tumorgewebe bei kurativen oder diagnostischen Operationen

Aus chirurgisch entnommenem Gewebe wurden noch im Operationsaal oder im pathologischen Institut mit sterilem Besteck Tumorgewebsstücke herauspräpariert und steril in MEM-Dulbecco Medium überführt und wie unter 2.3.5 beschrieben weiterverarbeitet.

2.1.2.6 Postmortale Entnahme von Tumorgewebe

Bei Patienten mit kleinzelligen Bronchialtumoren wurde nach Abschluß der makroskopischen Beurteilung durch den Pathologen innerhalb von 6 Stunden nach Eintritt des Todes Gewebe entnommen. Dazu wurde nach Öffnen der Lunge, bzw. der von Metastasen befallenen Organe durch den Pathologen mit einem sterilen Besteck Primärtumorgewebe und nach Möglichkeit zusätzlich Metastasengewebe herauspräpariert und in steriles MEM-Dulbecco Medium überführt. Das Tumorgewebe wurde dann wie unter 2.3.2 oder 2.3.5 beschrieben weiterverarbeitet.

2.1.3 Aufschluß von Tumorgewebe

Tumorgewebe, das wie unter 2.1.2.6 beschrieben gewonnen worden war, wurde in H_2O bzw. 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, und Protease-Inhibitoren (0,03 mg/ml Phenylmethylsulphonylfluorid; 0,03 mg/ml p-Mercuribenzoat (Sigma, München); 0,1 mg/ml EDTA (Merck, Darmstadt) für zwei Minuten mit einem Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel KG, Staufen) homogenisiert. Un-

mittelbar darauf erfolgte eine Zentrifugation bei 50.000 xg für 30 min. Der Überstand wurde für verschiedene Untersuchungen verwendet und konnte ohne größere Peptidhormonverluste 6 Monate bei -70 °C gelagert werden.

2.2 Analytische Methoden

2.2.1 Peptidhormonbestimmungsmethoden

ACTH, β -Lipotropin und Calcitonin wurden mit Hilfe von radioimmunologischen Methoden bestimmt. Zur Bestimmung von ACTH und β -Lipotropin wurden Radioimmunoassays verwendet, bei denen das nicht in Immunkomplexen gebundene ^{125}J -markierte Antigen an Dextranaktivkohle absorbiert wurde (ACTH, CEA Sorin France; β -Lipotropin, NEN Chemicals, Dreieich).

Zur Analyse von Calcitonin wurden Doppelantikörper-Assays eingesetzt. Bei dieser Technik wird das in den Immunkomplexen vorliegende ^{125}J -markierte Antigen durch einen zweiten Antikörper gegen Immunglobulin ausgefällt (Immuno Nuclear Corporation Stillwater, Minnesota) (50, 64, 65).

2.2.1.1 Auswertung der Peptidhormonbestimmung

Bei den verwendeten radioimmunologischen Tests wurde, da es sich um kompetitive "bound count" Immunoassays handelte, zunächst das prozentuale Verhältnis der gebundenen Radioaktivi-

tät im Test (B) im Vergleich zum Nullstandard (B_0) ermittelt. Dabei war jedoch die unspezifische Bindung (N) zu berücksichtigen. Die maximale Bindung im Test (B_0) sollte dabei zwischen 30 und 45 % betragen.

$$X = \frac{(B-N)}{(B_0-N)} \times 100$$

Die mit Hilfe dieser Formel errechneten Werte wurden gegen die entsprechenden Werte aus der Standardkurve aufgetragen, um den Peptidhormongehalt zu ermitteln, wobei aufgrund der Form der Standardkurve nur Porbenwerte zwischen 35 und 65 % Bindung bezogen auf B_0 zuverlässige Meßwerte ergaben. Werte oberhalb dieses Bereiches mußten durch Verdünnen ermittelt werden. Für dieses Testverfahren ergab sich eine Wiederfindungsrate zwischen 95 und 100 %. Der Variationskoeffizient innerhalb eines Tests lag dabei immer unter 5 % und bei verschiedenen Tests immer unter 10 % (65).

2.2.2 Proteinbestimmungen

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Lowry et al. (66) durchgeführt.

Während der Anreicherung von Peptidhormon-immunreaktivem Material aus verschiedenen Ausgangsmaterialien wurde die Proteinauftrennung qualitativ verfolgt durch die Messung der Absorption bei 280 nm in den einzelnen Fraktionen, bzw. durch die kontinuierliche Registrierung der Absorption

bei 280 nm mit Hilfe eines Durchflußphotometers.

2.2.3 Bestimmung von IgG mit Hilfe der radialen Immundiffusion nach Mancini (67)

Das Meßprinzip der radialen Immundiffusion beruht darauf, daß Antigene in einer Gelmatrix, die das korrespondierende Antiserum enthält, im Äquivalenzbereich unlösliche Immunkomplexe bilden, deren Diffusionsgeschwindigkeit gegen Null geht. Im vorliegenden Fall wurden zur IgG-Bestimmung jeweils 5 µl Antigenprobe in eine vorgestanzte Auftragstelle in einer 1,5 %igen Agarosegelschicht, die 0,1 % polyvalentes Anti-Human-IgG-Antiserum vom Kaninchen (Behringwerke, Marburg) enthielt, aufgetragen. Das Antigen diffundiert in das Gel ein und es bildet sich ein Antigen-Antikörper Komplex. Nach 5tägiger Diffusion wird durch Erreichen der Äquivalenzzone der Endpunkt der Diffusion erhalten. Die Fläche des Präzipitates ist der Konzentration an Antigen direkt proportional.

2.2.4 Nachweis von Antigenen in Polyacrylamid-Gradientengelen (s. 2.3.1.8) durch Immunpräzipitation in Agarosegelen

1 %ige Agarose (Serva, Heidelberg) wurde in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, plus 0,1 NaN₃ durch Erhitzen gelöst. Nach dem Abkühlen der Agarose im Wasserbad auf 46 °C wurde soviel anti-Human-IgG (Behringwerke, Marburg) hinzugegeben, daß eine 2,5 %ige Lösung entstand. Die Agarose wurde ca.

1,5 mm hoch auf Glasscheiben mit einer Kantenlänge von 2 x 5 cm ausgegossen und bei Zimmertemperatur erstarren lassen. Nach dem Festwerden wurde das Agarosegel auf das zu analysierende Polyacrylamidgradientengel (s. 2.3.1.8) aufgelegt und mit einem 100 g-Gewicht beschwert, so daß ein vollständiger, über die ganze Länge schließender Kontakt mit dem Polyacrylamidgel gewährleistet war. Nach einer 12-stündigen Inkubation in einer feuchten Kammer bei 37 °C wurde das Agarosegel 3 x 12 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung gewässert. Das Agarosegel wurde getrocknet und mit Servablau 250 R (Serva, Heidelberg) 30 min. gefärbt. Nach dem 12-stündigen Entfärben in 7 %iger Eisessiglösung wurden die Immunpräzipitate mit den proteingefärbten Banden des Polyacrylamidgradientengels verglichen.

2.2.5 Nachweis von Calcitonin- und Adrenocorticotropin-immunreaktivem Material in Gefrierschnitten von kleinzelligem Lungentumorgewebe durch indirekte Immunfluoreszenz (68)

Tumorgewebsstücke, die wie unter 2.1.2.5 und 2.1.2.6 beschrieben, gewonnen worden waren, wurden auf Korkscheiben von 1,5 cm Durchmesser gelegt und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff eingefroren und gleichzeitig auf diesen Korkscheiben fixiert. Im Anschluß daran wurden von den Gewebeblöcken mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (SELL,

Mainz) bei -25°C 6-8 μm dicke Schnitte angefertigt. Nachdem die Schnitte 20 min. bei 20°C an der Luft getrocknet worden waren, wurden sie mit ca. 10-15 μl 1:50 verdünntem Antiserum gegen humanes ACTH bzw. Calcitonin (Immunonuclear Corporation, Minnesota) überschichtet und 30 min. in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurden sie 3x10 min. in phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung, pH 7,4, gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 30 μl ca. 1:30 verdünntem Fluorescein-gekoppeltem Anti-Kaninchen- γ -Globulin von der Ziege (Behringwerke, Marburg), das zuvor 30 min. mit 200 $\times\text{g}$ bei 4°C zentrifugiert worden war, überschichtet und 30 min. in der feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden 3x45 min. mit phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mit gepuffertem Glycerin eingedeckt (phosphatgepufferte Kochsalzlösung - Glycerin 1:10). Als Kontrollen wurden Schnitte anstatt mit Antiserum mit phosphatgepufferter, physiologischer Kochsalzlösung sowie Kaninchenserum und Immunglobulin vom Kaninchen inkubiert. Die so gewonnenen Immunfluoreszenzpräparate wurden innerhalb von 16 Stunden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss-Standard, Obercochem) mit der Filterkombination BP 455, FT 510, LP 520 ausgewertet und auf Agfaortho 50 Professional Filmen fotografiert.

2.2.6 Zytodiagnostik

Zur diagnostischen Differenzierung von Tumorzellen wurden Zellen aus Zellsuspensionen in einer Zytozentrifuge (Shan-

don Southern, Frankfurt) 10 Minuten bei 20 °C mit 350 xg direkt auf einen Objektträger zentrifugiert. Bei dieser Technik wurden die Zellen ins mikroskopische Betrachtungsfeld konzentriert und gleichzeitig ausgebreitet. Unmittelbar im Anschluß an die Zentrifugation wurden die Präparate panoptisch nach Pappenheim gefärbt (69): Sie wurden 3 min. in May Grünwald Eosin-Methylenblau-Lösung (Merck, Darmstadt) inkubiert und unter fließendem Wasser gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Präparate 5 min. in 1:30 verdünnter Giemsa Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung (Merck, Darmstadt) nachgefärbt und danach erneut 3 min. unter fließendem Wasser gewaschen und im Durchlichtmikroskop (Zeiss SM-Lux, Obercochem) auf maligne Zellen analysiert. Die fotografischen Aufnahmen wurden mit Agfa-ortho 50 Professional durchgeführt.

2.2.7 Zählung von Zellen in Suspension

Zellzählungen von Zellen in Suspension wurden in einer Erythrozytenzählkammer (Neubauer-Zählkammer) durchgeführt.

2.2.8 Zählung von adhärent-wachsenden Zellen in Kulturflaschen

Das Zählen von adhärent-wachsenden Zellen in Kulturflaschen wurde nach einem Mediumwechsel mit Hilfe eines Umkehrmikroskopes (Olympus CK, Tokio) durchgeführt. Dazu wurde ein Gitternetz mit Gitterquadraten von 1x1 mm Fläche unter die

Flasche gelegt. Durch Auszählen repräsentativer Quadrate konnte die Zellzahl pro Kulturflasche errechnet werden. Außerdem wurden die adhärent wachsenden Zellen, wie unter 2.3.4 beschrieben, mit Trypsin behandelt und anschließend in einer Erythrozytenzählkammer gezählt (2.2.7). Zur Dokumentation wurden die Zellen mit Ilford PANF 135 fotografiert.

2.3 Präparative Methoden

2.3.1 Anreicherung und Charakterisierung von Calcitonin- und ACTH-immunreaktiven Proteinen aus verschiedenen Untersuchungsmaterialien von Tumorpatienten

2.3.1.1 Gelfiltration

Gelfiltrationen wurden in Gegenwart von 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, 0,2 M NaCl und Proteaseinhibitoren (0,03 mg/ml Phenylmethylsulphonylfluorid, 0,03 mg/ml p-Mercuribenzoat, 0,1 mg/ml EDTA) bei 4 °C an Ultrogel Aca 54 (LKB, Stockholm) durchgeführt. Für die Chromatographien an Aca 54 wurden Glassäulen mit 2,5 cm Durchmesser und einer Gelbettlänge von 110 cm bzw. 80 cm verwendet. Die Durchfließgeschwindigkeit betrug 14 ml/h.

Bei Aca 54 Gel handelt es sich um eine Polyacrylamidagarose-Matrix, bei der die unspezifischen Absorptionen der in der Probe enthaltenen Proteine mit dem Gel geringer sind als bei Agarose- oder Dextran-Gelen. Absorptionen oder Ionen-

austauscheffekte zwischen Probenproteinen und der Gelmatrix können durch den Gebrauch von Pufferlösungen mit einer Ionenstärke von mindestens 0,05 vermieden werden, da diese Gele nur sehr wenige anionische Gruppen in der Gelmatrix enthalten (70, 71). Der effektive Fraktionierungsbereich mit einer guten Trennschärfe liegt bei AcA 54 zwischen 5 und 70.000 Dalton, wobei Eichläufe mit Bromphenol-Blau-Natriumsalz (MW 692), Cyanocobalamin (MW 1.355) (Serva, Heidelberg), synthetischem Humancalcitonin 1-32 (MW 3.425) (Calbiochem, Gießen), Ribonuklease A (MW 13.700), Myoglobin (MW 17.000) (Serva, Heidelberg), Chymotrypsinogen A (MW 25.000), Ovalbumin (MW 43.000), Albumin (MW 67.000), Aldolase (MW 158.000), Katalase (MW 232.000), Dextran-Blau 2000 (MW 2.000.000) (Pharmacia Uppsala) ergaben, daß bei Säulen mit 110 cm Gelbettlänge auch noch im Bereich von 3.000 bis 160.000 eine ungefähre Zuordnung der Molekulargewichte möglich ist.

2.3.1.2 Ionenaustauschchromatographie (72, 73)

Ionenaustauschchromatographien wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5, 0,2 M NaCl bzw. in 15 mM Tris-Glycin-Puffer, pH 8,0, 0,2 M NaCl an DEAE Sephacel (Pharmacia Uppsala) bzw. Carboxymethylzellulose (CM 52, Wathman, Springfield) in Säulen mit Gelbettvolumen von 1,2 bis 5 ml durchgeführt. Nachdem das Gelbett mit dem 10-fachen Säulenvolumen des verwendeten Puffers äquilibriert

worden war, wurden die Proben aufgetragen und erneut mit dem 10fachen Säulenvolumen gespült. Eluiert wurde entweder mit einem pH-Sprung in den leicht sauren Bereich oder mittels eines NaCl-Gradienten. Der Durchfluß der Säule wurde in 2 ml Fraktionen aufgefangen.

2.3.1.3 Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose (74, 75)

Affinitätschromatographien an Protein A-Sepharose (Pharmacia, Uppsala) wurden in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, an Säulen mit Gelbettvolumen von 2-5 ml durchgeführt. Das Gel wurde mit dem 15- bis 20fachen Säulenvolumen des verwendeten Puffers äquilibriert und nach dem Auftrag der Proben mit dem 10fachen Säulenvolumen gespült. Eluiert wurde mit 100 mM Glycin-HCl-Puffer, pH 3. Der gesamte Säulendurchlauf wurde in 1 ml Portionen fraktioniert. Fraktionen mit einem pH-Wert unter pH 5 wurden mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.

2.3.1.4 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose (76, 77), Lentil-Lectin-Sepharose 4b und Wheat Germ Lectin-Sepharose (78, 79)

Alle Chromatographien wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, und 15 mM Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3, in Säulen mit Gelbettvolumen von 2 bis max. 6 ml durchgeführt. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gelbett (alle Gele Pharmacia,

Uppsala) mit dem 15fachen Säulenvolumen des verwendeten Puffers äquilibriert. Nach dem Auftragen der Proben wurde mit dem 5fachen Säulenvolumen gewaschen und entweder mit 10 mM α -D-Mannose oder 100 mM Glycin-HCl-Puffer, pH 3, eluiert. Die Säulenverläufe wurden in 2 ml Fraktionen aufgefangen. Bei Fraktionen, deren pH-Wert unter einem pH von 5,0 lag, wurde der pH mit Hilfe von 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Zur Bestimmung von ACTH-Immunreaktivität in den Säulenfraktionen wurden diese zunächst wie unter 2.3.3 beschrieben dialysiert.

2.3.1.5 Affinitätschromatographie an Cibacron Blue F 3 GA (Blue Sepharose CL 6b) (80)

Affinitätschromatographien an Cibacron Blue (Pharmacia Uppsala) wurden in Säulen mit einem Gelbettvolumen von 5-20 ml durchgeführt. Zunächst wurden die Säulen mit dem 3fachen Säulenvolumen einer 1,5 mM KCl-Lösung in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, gewaschen. Anschließend wurde das Kaliumchlorid mit dem 10fachen Volumen an Phosphatpuffer vollständig ausgewaschen. Zur Vermeidung irreversibler Adsorption von ACTH-immunreaktiven Proteinen wurden die Säulen mit dem 2fachen Säulenvolumen einer 1 %igen Rinderserumalbumin-Lösung in Phosphatpuffer abgesättigt. Nachdem das Gelbett mit dem 10fachen Säulenvolumen des verwendeten Puffer äquilibriert worden war, wurden die Proben aufgetragen und erneut mit dem 10fachen Säulenvolumen

gespült. Eluiert wurde mit 1,5 mM KCl in Säulenpuffer. Das Eluat wurde in 2 ml-Fractionen aufgefangen. Die Fractionen wurden vor der radioimmunologischen Bestimmung von ACTH dialysiert (s. 2.3.3).

2.3.1.6 Immunaффinitätschromatographie an Sepharose gekoppelten Anti-ACTH-Antikörpern

Immunaффinitätschromatographien wurden mit Antikörpern vom Kaninchen gegen synthetisches ACTH, das an Sepharose 4b immobilisiert war, durchgeführt. Mit dieser Anti-ACTH-Sepharose (Immuno Nuclear Corporation Stillwater, Minnesota) wurden Säulen mit einem Gelbettvolumen von 0,6 - 0,7 ml hergestellt. Diese Säulen wurden mit einem 12fachen des Säulenvolumens in 50 mM Phosphatpuffer, 0,2 mM NaCl äquilibriert. Danach wurden die Säulen mit 5 ml normalem Humanserum abgesättigt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach dieser Behandlung wurden die Säulen mit dem 12fachen Volumen des Säulenpuffers gewaschen. Nach dem Auftragen der Proben wurde mit dem 30-50fachen Säulenvolumen des Äquilibrierungspuffers erneut gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 mM Glycin-HCl-Puffer, pH 3,0. Die Eluate wurden in 1 ml Fractionen aufgefangen. Vor der anschließenden radioimmunologischen Bestimmung des Gehaltes an ACTH-Immunreaktivität wurde in den Säulenfraktionen mit einem pH unter 5,0 dieser mit 0,5 mM NaOH auf pH 7,0 eingestellt.

2.3.1.7 Polare Chromatographie an Silicagelen (81)

Säulen mit einem Gelbettvolumen von 1 ml Silicagel (Walters,

Milford, Massachusetts) wurden zunächst mit 3 ml Methanol gespült und anschließend mit 8 ml H₂O äquilibriert. Nach dem Auftragen von 2 ml Probenvolumen wurden die Säulen mit 8 ml 25 mM Natriumphosphatpuffer gewaschen. Eluiert wurde mit 2 ml Chloroform. Die Säulenfraktionen wurden in 1 ml Portionen aufgefangen. Die chloroformhaltigen Fraktionen wurden mit Stickstoff zur Trockne verblasen und in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert.

2.3.1.8 Polyacrylamidgradientengelelektrophoresen zur
Trennung von Calcitonin- bzw. Adrenocorticotropin-
immunreaktivem Material modifiziert nach Laemmli (82)

Es wurden fünf verschiedene Gellösungen mit 7,5, 10, 12,5 und 15 % Acrylamid (Serva, Heidelberg) benötigt. Zur Herstellung 7,5 %iger Gele wurden 4,7 ml Stammlösung 1 (40 % Acrylamid, 1,06 % Methylen-Bis-Acrylamid (Serva, Heidelberg) in H₂O, 5 ml Stammlösung 2 (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,3 % SDS), 0,02 ml N, N, N'-N'-Tetramethylethyldiamin (Serva, Heidelberg), TEMED, 0,07 ml 10 %iges Ammoniumperoxodisulfat (Merck, Darmstadt) und 8 ml H₂O gemischt. Zur Herstellung der drei höher prozentigen Gellösungen wurde das Volumen der Stammlösung 1 entsprechend erhöht, und weniger H₂O zugesetzt. Aus 10- bis 15 %iger Gellösung wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers von unten nach oben in Kammern von 11x10, 8x2 cm oder 15x10, 8x0,2 cm mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe ein kontinuierlicher Gradient gepumpt. Der Gradient wurde

vorsichtig mit Wasser überschichtet und 30 min. zum Polymerisieren stehengelassen. Nach dem Abgießen des Wassers wurde der Gradient mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet. Für das Sammelgel wurde Stammlösung I entsprechend verringert und an Stelle von Stammlösung II 0,5 M Tris- HCl, pH 6,8, 0,3 % SDS verwendet. Nach erneuten 30 min. Polymerisation wurde der Kamm zur Herstellung der Proben-taschen gezogen und das Gel verwendet. Die zu untersuchen-den Proben wurden mit dem gleichen Volumen des folgenden Probenpuffers versetzt und 30 min. bei 56 °C inkubiert: 65 mM Tris, 2 % SDS (Merck, Darmstadt), 7,5 % Glycerin, 0,1 % Bromphenol-Blau, pH 8,6. Zum Reduzieren der Proben wurden 5 µl einer 50 mM Dithioerytritolösung (Serva, Heidel-berg) pro 20 µl Probenvolumen zugegeben. Die elektropho-retische Trennung erfolgte in 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3, bei 110 V bis die Bromphenol-Blau-Bande das Trenngel erreicht hatte. Danach wurde die Spannung auf 200 Volt erhöht. Unmittelbar bevor die Bromphenol-Blau-Bande das untere Gelende erreichte, wurde die Trennung be-endet.

Gelelektrophoresen ohne Denaturierung der Proteine mit SDS wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Bei diesen Trennungen enthielt keine der verwendeten Gelkompo-nenten SDS oder Dithioerytrit. Sofort nach dem Lauf wurden die Kanäle mit dem Eichprotein mit Hilfe von Rasierklingen vom übrigen Gel getrennt und mit Serva-Blau 250 R (Serva, Heidelberg) gefärbt. In Anlehnung an die Arbeiten von

Goltzmann und Tischler (43) wurden unter nicht denaturierenden Bedingungen gelaufene Gele sofort nach dem Lauf zwei Stunden bei 20 °C in isotonischer Kochsalzlösung gewässert. Gele, die in Gegenwart von SDS und mit und ohne DTE durchgeführt worden waren, wurden 6 Stunden unter den genannten Bedingungen gewässert. Danach wurden die Gele in die einzelnen Laufkanäle getrennt und in 2,5 mm dicke Scheiben zerschnitten. Jede dieser Scheiben wurde in 300 µl 0,1 M Boratpuffer, pH 8,4, und 0,4 % Rinderse-
rumalbumin 20 Stunden unter ständigem Schütteln bei 4 °C eluiert.

2.3.1.9 Inkubation von Serum mit Calcitonin verschiedener Herkunft

3 ml Serum von gesunden Kontrollpersonen wurden für 2, 4, 26 und 36 Stunden in Gegenwart von 0,5 ng Humancalcitonin (Calbiochem, Gießen; Paesel, Frankfurt; Immuno Nuclear Stillwater, Minnesota) bei 37 °C inkubiert.

2.3.1.10 Inkubation von Serum mit verschiedenen ACTH-Präparationen

3 ml Serum von gesunden Kontrollpersonen sowie von Patienten mit positivem Immunkomplexnachweis ohne nachweisbare ACTH-Immunreaktivität im Serum wurden für 2 Stunden bei 37 °C mit ACTH 1-24, 1-39 synthetischem Human-ACTH, 1-39

ACTH vom Schwein (Calbiochem, Gießen), 18-39 synthetischem Human-ACTH (Bachem, Bubendorf, Schweiz), 1-39 synthetischem Human-ACTH (Ferring, Kiel) und 1-39 ACTH vom Schwein (Serva, Heidelberg) inkubiert.

2.3.2 Dialyse von ACTH-immunreaktiven Proteinfraktionen

Zur Dialyse von ACTH-immunreaktiven Proteinfraktionen wurden Spektrapor-Dialyseschläuche (Reichelt-Chemie, Heidelberg) mit einem Ausschlußvolumen von 3.500 Dalton verwendet. Zur Vermeidung von Absorptionseffekten von ACTH-immunreaktiven Proteinen an die Dialyseschläuche wurden diese 24 Stunden in 1 %iger Rinderserumalbumin-Lösung in 24 mM Natriumphosphatpuffer bei 4 °C inkubiert. Die Proteinproben wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer gegen das 1000fache Probenvolumen 12 Stunden bei 4 °C dialysiert.

2.3.3 Proteolytischer Abbau von Peptidhormon-immunreaktiven Proteinfraktionen

Peptidhormone enthaltende Proteinfraktionen wurden 4, 6 und 20 Stunden mit 0,3 mg/ml Trypsin aus Rinderpankreas (35 U/mg, Serva, Heidelberg) bei 4 °C unter langsamem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 1 mg/ml Trypsininhibitor aus Sojabohnen (30 U/mg, Sigma, München), gestoppt. Pepsininkubationen wurden mit 0,3 mg/ml Pepsin vom Schwein (2.900 U/ml, Serva, Heidelberg) bei 4 °C in 50 mM Glycin-HCl, pH 3, 4, 6 und 20 Stunden bei 4 °C un-

ter langsamem Schütteln durchgeführt. Nach diesem Zeitraum wurde die Reaktion durch Einstellen des pH-Wertes auf 8,3 mit 1 N NaOH gestoppt.

2.3.4 Kultivierung von permanenten Tumorzelllinien (83)

Permanente Tumorzelllinien wurden aus kleinzelligen und großzelligen Plattenepithel- sowie Adeno-Lungentumoren angelegt. Die, wie unter 2.1.2 beschrieben, gewonnenen Tumorgewebstücke wurden nach dem Transport in einer sterilen Werkbank (Typ 2005 HPS Waldner, Wangen/Allgäu) oder in einer Laminar-Air Flow (BH-26 TG, Flow GmbH, Meckenheim) zweimal 10 min. mit einer Antibiotikallösung (0,5 g Streptomycin, 50.000 U Penicillin und 250 g Amphotericin B) in 1 ml phosphatgepufferter isotonischer NaCl-Lösung, pH 7,0, gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit zwei sterilen Einwegskalpellen von gegebenenfalls anhaftendem Bindegewebe bzw. von dem Tumor nicht infiltriertem Lungen- oder Lebergewebe befreit. Ein Teil wurde bis zur Homogenisation, wie unter 2.1.3 beschrieben, bei -70°C eingefroren. Gewebsstücke zur Anlage permanenter Tumorzelllinien wurden in $1-3\text{ mm}^3$ große Stücken geschnitten und die Zellen $3 \times 15\text{ min.}$ bei 20°C mit $0,5\text{ mg/ml}$ Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* (Boehringer, Mannheim) in phosphatgepufferter calcium- und magnesiumfreier physiologischer Kochsalzlösung enzymatisch disintegriert. Anschließend wurden die Zellen noch dreimal mit $0,5\text{ mg/ml}$ Kollagenase und $0,25\%$ Trypsin in phosphatgepuf-

ferter calcium- und magnesiumfreier physiologischer Kochsalzlösung inkubiert. Die auf diese Weise vereinzelter Zellen wurden dann in MEM-Dulbecco Medium (Boehringer, Mannheim) mit 16,6 % foetalem Kälberserum (Boehringer, Mannheim) in Kulturschalen mit 2 cm Kulturfläche (Nunc Roskilde, Dänemark) in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Foetales Kälberserum, nach Angaben des Herstellers bereits steril, wurde unmittelbar vor dem Gebrauch noch einmal durch einen sterilen Einmalfilter mit 0,22 Mikron Porenweite (Falcon, Becton u. Dickinson, Heidelberg) filtriert, um die Kontaminationsgefahren durch infektiöses foetales Kälberserum zu vermeiden. Die Zellzahl wurde durch Auszählen der Tumorzellen in einer Erythrozytenzählkammer eingestellt. Nach dem Wachstum bis zur Konfluenz bzw. einer Zellzahl von $1-5 \times 10^6$ wurden die Kulturmedien auf ihren Peptidhormongehalt untersucht. Die Zellen aus Kulturschalen mit positivem Peptidhormonnachweis wurden in Mikrotestplatten mit 0,32 cm Kulturfläche subkloniert, erneut analysiert und durch stufenweises Vergrößern der Kulturflächen schließlich in 25 cm² Schräghalsgewebekulturflaschen kultiviert. Zellkulturen, die nicht sofort weiteruntersucht wurden, wurden in flüssigem Stickstoff, wie unter 2.3.6 beschrieben, eingefroren und gelagert.

2.3.5 Partielle Reinigung von Tumorzellen aus Knochenmarksbiopsien sowie malignen Ergüssen bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom (84)

Nach der sterilen Entnahme, wie unter 2.1.2.2 beschrieben, des Knochenmarkzylinders bzw. des malignen Ergusses wurde

zunächst, wie unter 2.2.6 beschrieben, eine Zytodiagnostik durchgeführt. Beim positiven Nachweis von malignen bzw. malignitätsverdächtigen Zellen wurden das Knochenmarkaspirat bzw. der Erguß eine Stunde bei 20 °C mit 1 xg sedimentiert und anschließend 10 min. bei 20 °C mit 200 xg zentrifugiert. Die auf den Erythrozyten direkt aufsitzende, u.a. die Tumorzellen enthaltende Fraktion wurde vorsichtig, jedoch quantitativ mit Hilfe einer Pasteurpipette steril abgehoben. Von dieser Fraktion wurden 0,5 ml zytologisch analysiert. Der Hauptanteil dieser Fraktion wurde dann vorsichtig auf einen sterilen 4 °C kalten Ficoll-Gradienten aufgetragen und danach 30 min. bei 4 °C mit 800 xg zentrifugiert. Die mittlere der drei, während der Zentrifugation sich ausbildenden Zellfraktionen bei einer Dichte von 1,077, wurde unter Vermeidung jedes Aufwirbelns der anderen Fraktionen vollständig abgenommen. Ein Aliquot dieser Fraktionen von 0,5 ml wurde zytologisch analysiert. Die Fraktion wurde 1:10 in sterilem MEM-Dulbecco Medium verdünnt und 10 min. bei 20 °C mit 200 xg zentrifugiert. Die Zellen wurden im MEM-Dulbecco Medium mit 16,6 % foetalem Kälberserum resuspendiert. In einer Erythrozytenzählkammer wurde die Zellzahl ermittelt und 10^5 Zellen/ml in Schräghalszellkulturflaschen (Falcon, Becton und Dickinson, Heidelberg) ausgesät und wie unter 2.3.4 beschrieben weiterkultiviert.

2.3.6 Weichagarklonierung von Lungentumorzellen (85, 86)

10 ml einer 5 %igen Lösung von Agar in H_2O wurden eine Stunde in einem sterilen Gefäß gekocht. Danach wurde diese Lö-

sung im Wasserbad auf 46 °C heruntergekühlt. Von dieser Stammlösung wurde unter sterilen Bedingungen soviel in ein auf 41 °C vorgewärmtes MEM-Dulbecco Medium mit 16,6 % foetalem Kälberserum hinzugefügt, daß eine 0,5 %ige Lösung entstand. 10 ml dieser Lösung wurden in einer Petrischale ausgegossen, so daß eine 2-3 mm hohe Schicht entstand. Der Boden dieser Petrischale bestand aus einer hydrophilen gasdurchlässigen Membran (Heraeus, Hanau). Nach dem Erstarren der 0,5 %igen Agarschicht wurde diese in der gleichen Weise mit 10 ml einer 0,3 %igen Agar-Lösung überschichtet. In dieser wurde unmittelbar nach Abkühlung der Lösung auf 37 °C 1 ml einer 10^4 bis 10^5 Zellen/ml enthaltenden Tumorzellsuspension verteilt. Die Platten wurden alle 3-4 Tagen im Phasenkontrastmikroskop durchgemustert und die entstehenden Klone dokumentiert. Dicht nebeneinander entstehende Klone wurden unter phasenkontrastoptischer Kontrolle voneinander abgetrennt, um monoklonale Tumorzellkulturen zu erhalten.

2.3.7 Lagerung von Zellkulturen

Zellkulturen, die nicht sofort weiteruntersucht werden sollten, wurden in bis -196 °C stabilen Polypropylen-Schraubröhrchen (Nunc, Roskilde, Dänemark) in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren wurden die Zellen in MEM-Dubeco's auf 0 °C abgekühlt und durch tropfenweises Hinzugeben von sterilfiltriertem kaltem DMSO bis zu einem 10 %igen DMSO-Gehalt äquilibriert und sofort danach in einem programmierbaren Einfrierautomaten (BV/4 Cryoson, Schöllkrippen)

mit einem eigens für diese Zellen adaptierten Einfrierprogramm kontrolliert auf -95°C abgekühlt. Von dort wurden sie dann in ein -196°C Lagergefäß überführt, wo sie dann über Jahre hinaus gelagert werden können.

2.3.8 Auftauen der bei -196°C gelagerten Zellen

Die Zellen wurden in den Polypropylen-Schraub Röhrchen im Wasserbad innerhalb von einer Minute von -196°C auf 37°C gebracht. Danach wurden max. 8×10^6 Zellen zweimal mit 10 ml MEM-Dulbecco + 33 % foetalem Kälberserum suspendiert und dann 10 min. bei 4°C mit 800 xg zentrifugiert. Danach wurden die Zellen ausgezählt und 10^5 Zellen in Kulturflaschen in Kulturmedium mit 16,6 % foetalem Kälberserum, wie unter 2.3.4 beschrieben, kultiviert.

3. ERGEBNISSE

Die einleitend formulierte Forderung nach einem spezifischen Test für die vermutlich von Lungentumorzellen gebildeten ACTH- und Calcitonin-immunreaktiven Proteine setzt zunächst eine Anreicherung dieser Proteine voraus, verbunden mit ihrer biochemischen Charakterisierung.

3.1 Identifizierung von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen aus Serum von Lungentumorpatienten

Zur Klärung der Frage, ob es sich bei der immunologisch im Serum und Plasma von Tumorpatienten nachweisbaren Calcitoninaktivität um physiologisches Calcitonin mit einem Molekulargewicht von 3.400 Dalton handelt oder um ein oder mehrere andersmolekulare Proteine wurden zunächst Seren von Tumorpatienten durch Gelfiltration an AcA 54 aufgetrennt (2.3.1.1). Wie in Abb. 3 dargestellt, lassen sich dabei drei Calcitonin-immunreaktive Proteinfractionen mit Molekulargewichten von 100.000, 48.000 und 20.000 Dalton voneinander unterscheiden. In dem Serum von Patienten mit Lungentumoren ist kein physiologisches Calcitonin nachweisbar.

Wie in der Abb. 4 am Beispiel eines Patienten gezeigt wird, ist die Menge der im Blut von Tumorpatienten zirkulierenden Calcitonin-immunreaktiven Proteine offensichtlich stark mit der Stoffwechselaktivität des Tumors korreliert. Unter dem Einfluß der cytostatischen Therapie kommt es zu einer deutlichen

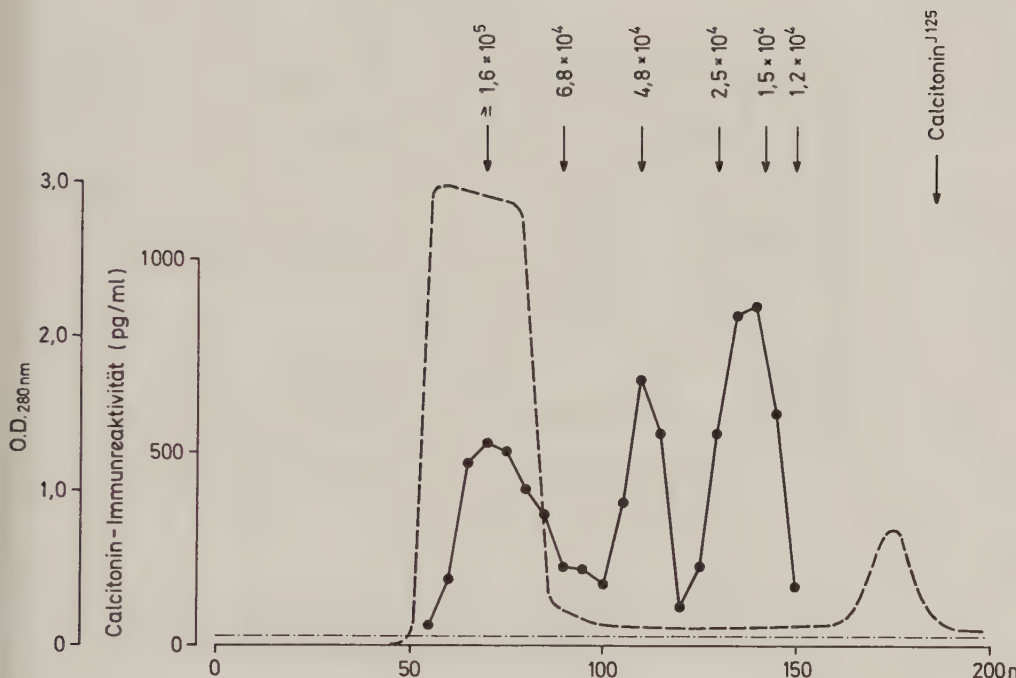


Abb. 3 Radioimmunologische Bestimmung von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen nach Auftrennung eines Patientenserums durch Gelfiltration an Aca 54

3 ml Patientenserum (s. 2.1.1) wurden auf eine Aca 54-Säule (2,5 x 110 cm) aufgetragen und mit einer Durchfließgeschwindigkeit von 16 ml/h (s. 3.1.1) aufgetrennt. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (---) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Fraktionen von 5 ml wurden aufgefangen und durch Gefriertrocknung um einen Faktor 10 konzentriert. In diesen Fraktionen wurde der Calcitoninegehalt (●—●) radioimmunologisch bestimmt (s. 2.2.1). Der 10fach konzentrierte Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen, die einer Calcitoninkonzentration von 25 pg/ml (---) $\pm$ 15 pg/ml entsprach.

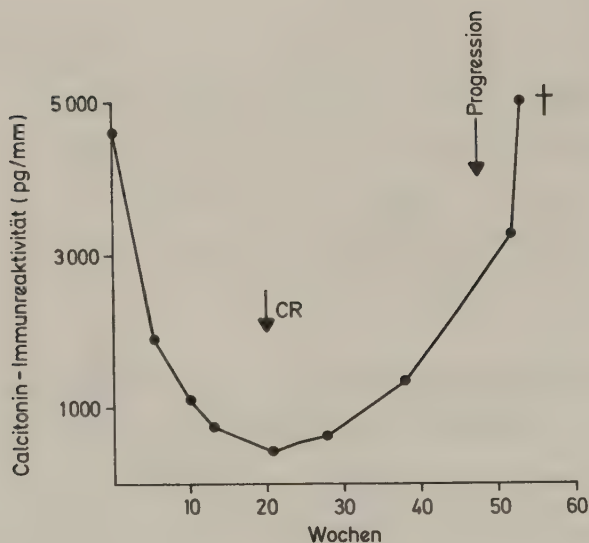


Abb. 4 Serienmäßige Calcitoninbestimmung bei einem Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom während einer Polychemo- und Strahlentherapie.

CR - Komplette Remission (Verschwinden aller klinisch erfaßten Tumorparameter)

Progression - Auftreten der klinischen Symptome einer erneuten Tumorprogression

Rückbildung des Tumors und daraus folgend zum völligen Verschwinden aller klinisch meßbaren Parameter. Parallel dazu zeigt sich ein deutlicher Abfall der Calcitoninkonzentration im Serum. Bei einer erneuten Progression des Tumors, welche mit einem Wiederanstieg der Stoffwechselaktivität des Tumors einhergehen muß, tritt ein kontinuierliches Ansteigen der serologisch meßbaren Calcitoninkonzentrationen häufig bereits Wochen vor einer klinisch manifest werdenden Progression des Tumors auf.

Um zu überprüfen, ob es neben der quantitativen Veränderung in der Syntheseleistung des Tumors auch zu einer qualitativen Verschiebung des Synthesemusters kommt, wurden Seren von Tumorpatienten zum Zeitpunkt der Diagnose, zum Zeitpunkt einer kompletten Remission und zum Zeitpunkt einer erneuten Tumorprogression durch Gelfiltration an AcA 54 aufgetrennt (Abb. 5). Bei einem Rückgang der Stoffwechselaktivität des Tumors nehmen alle drei Calcitonin-immunreaktiven Fraktionen gleichmäßig ab. Bei einem erneuten Anstieg der Syntheseleistung des Tumors kommt es zu einer Zunahme aller drei Calcitonin-immunreaktiven Fraktionen. Unter dem Einfluß der Cytostatika konnte also keine Verschiebung des Calcitonin-immunreaktiven Proteinmusters in der Zirkulation gefunden werden.

Zum Ausschluß unspezifischer Aggregationen von physiologischem Calcitonin mit Serumproteinen wurde synthetisches, bzw. durch Präparationen gewonnenes, physiologisches Calcitonin (2.3.1.9) mit dem Serum von gesunden Kontrollpersonen 2-36 Stunden inkubiert und anschließend an AcA 54 aufgetrennt (Abb. 6). Bei diesen Inkubationen konnten keine unspezifischen Aggregationen zwischen Plasmaproteinen und dem eingesetzten Calcitonin gefunden werden.

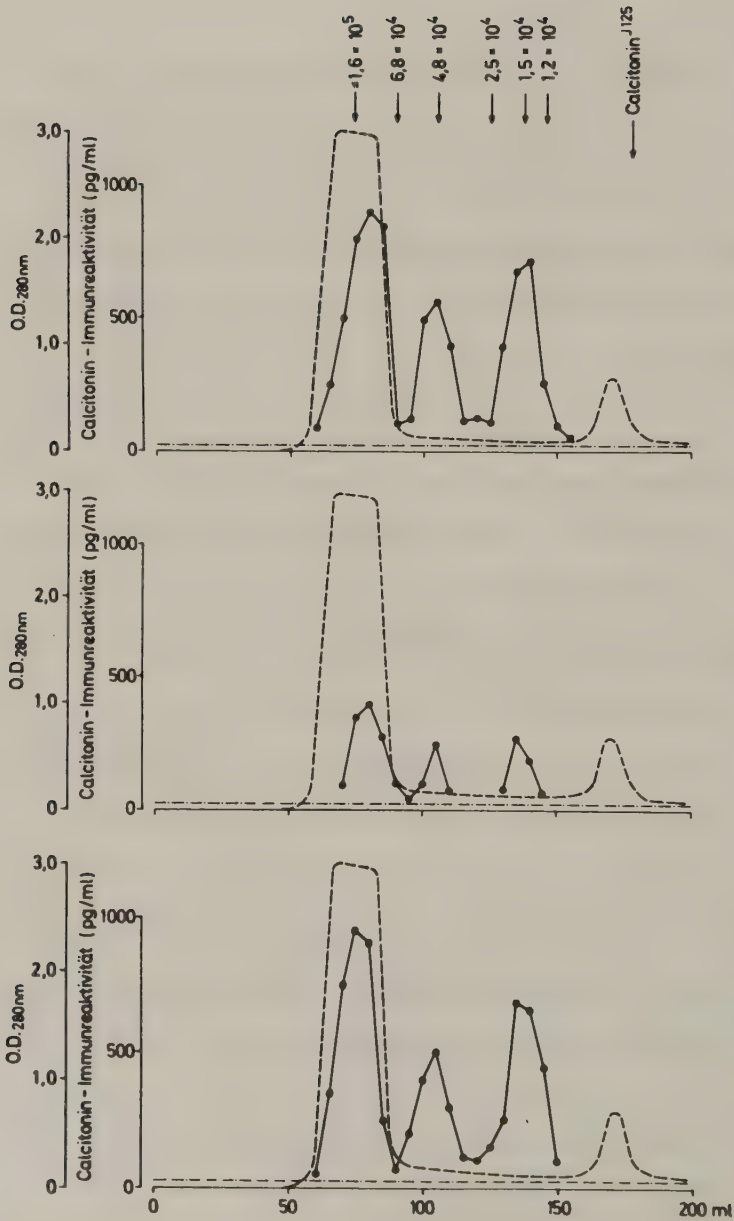


Abb. 5

Abb. 5 Gelfiltration von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen aus Serum eines Patienten während einer Polychemo- und Strahlentherapie.

3 ml Patientenserum (s. 2.1.1) wurden auf eine AcA 54-Säule (2,5 x 110 cm) aufgetragen und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h (s. 3.1.1) aufgetrennt. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Die Fraktionen wurden vor der radioimmunologischen Analyse auf Calcitonin-immunreaktive Proteine (●—●) (s. 2.2.1) durch Gefriertrocknung um einen Faktor 10 konzentriert.

oben - Patient vor Therapie

Mitte - Patient während der Therapie zum Zeitpunkt der klinischen Remission

unten - Patient zum Zeitpunkt der erneuten Tumorphorgression
Der konzentrierte Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen, die einer Calcitonin-Konzentration von 25 pg/ml (---) entsprach.

3.2 Nachweis von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen in Lungentumorgewebe durch indirekte Immunfluoreszenz

Die gezeigte Abhängigkeit der Menge von zirkulierenden Calcitonin-immunreaktiven Proteinen von der Tumormasse gab bereits einen ersten Hinweis auf einen direkten Zusammenhang zwischen der biosynthetischen Aktivität des Tumors und den im Serum nachgewiesenen Proteinen. Immunfluoreszenzoptische Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Vorstellung einer Biosynthese dieser Proteine durch die Tumorzellen selbst und nicht reaktiv auf das Tumorgeschehen durch die C-Zellen der Schilddrüse zu erhärten. Für diese Untersuchungen war es notwendig, möglichst frisches Tumormaterial, d.h. maximal 6 Stunden nach Ableben des Patienten gewonnenes Tumorgewebe, sofort in flüssigem Stickstoff auf den Trägerschei-

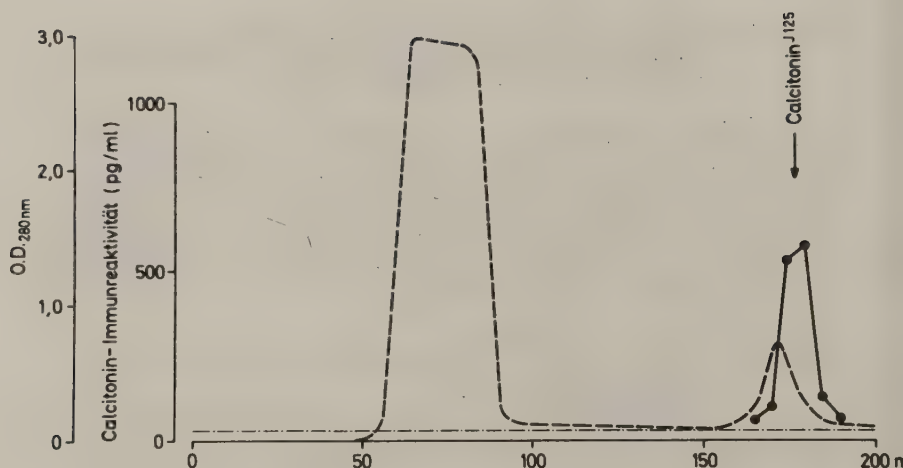
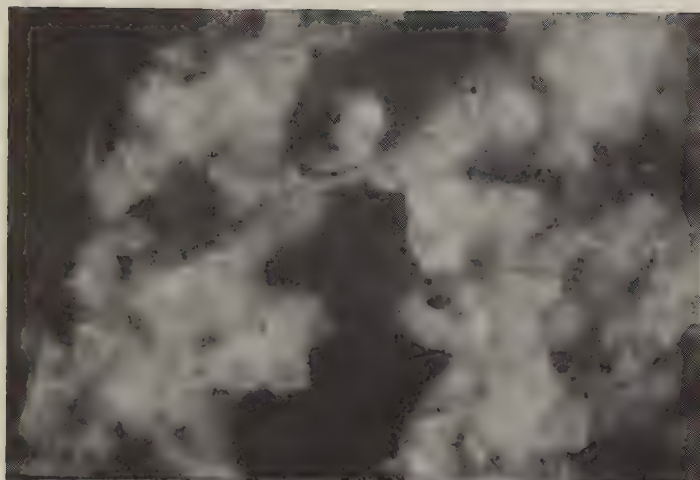


Abb. 6 Gelfiltration eines humanen Calcitonin-freien Serums nach 26 Stunden Inkubation mit synthetischem Humancalcitonin.

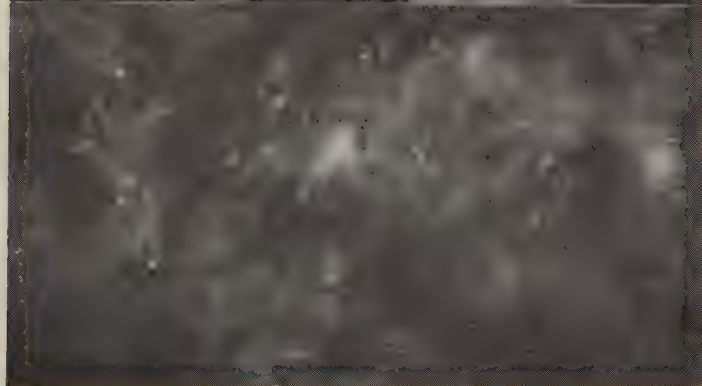
0,5 ng radioaktiv markiertes synthetisches Humancalcitonin wurde für 26 h mit 3 ml humanem Serum inkubiert. Das Serum wurde auf eine AcA 54-Säule (2,5 x 110 cm) aufgetragen und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h (s. 3.1.1) aufgetrennt. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Calcitonin (●●) wurde radioimmunologisch nach Konzentration der Fraktionen um einen Faktor 10 bestimmt (s. 2.2.1). Der 10fach konzentrierte Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen, die einer Calcitoninkonzentration von 25 pg/ml (---) $\pm$ 15 pg/ml entsprach.

Abb. 7

A



B



ben für das Gefriermikrotom zu fixieren. Bei Färbeversuchen von paraffinfixiertem pathologischem Routinematerial mit der Papptechnik nach Sternberger (87) war es nur schwer möglich, Calcitonin in den Gewebsschnitten nachzuweisen.

In Tumorgewebsschnitten von Patienten, die durch Calcitoninkonzentrationen von über 500 pg/ml Serum aufgefallen waren, konnte sowohl intrazellulär wie auch extrazellulär eine auf Antikörper gegen Calcitonin zurückzuführende Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 7a). Lungengewebsstücke derselben Patienten, die nicht vom Tumor infiltriert waren, zeigten hingegen keine Immunfluoreszenz (Abb. 7b). Ebenso negativ waren Tumorschnitte, die mit Kaninchen-Normalserum bzw. PBS anstelle von Anti-Calcitonin- γ -Globulin vom Kaninchen inkubiert worden waren (2.2.5).

Abb. 7a und 7b Nachweis von Calcitonin-immunreaktivem Protein in Gefrierschnitten von kleinzelligem Lungentumorgewebe durch indirekte Immunfluoreszenz.

Tumorgewebsstücke (A) sowie nicht vom Tumor infiltriertes Lungengewebe (B) wurden maximal 6 Std. nach Eintritt des Todes entnommen, in 2x2 mm große Stücke zerschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden von diesen Blöcken 6-8 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt, die nach dem Lufttrocknen mit Kaninchen-Antiserum gegen humanes Calcitonin für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit Fluorescein gekoppelten Antikörpern gegen Kaninchen γ -Globulin überschichtet und erneut für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Vergrößerung 400 x). Die mitgeführten Kontrollen mit Kaninchen γ -Globulin bzw. PBS anstelle des Antikörpers gegen Calcitonin zeigten keine Fluoreszenz (2.2.5).

3.3 Auftrennung von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen aus Tumorgewebeextrakten

Aufgrund großer Schwierigkeiten bei der Beschaffung von geeignetem frischen Tumorgewebe in ausreichenden Mengen wurde der naheliegende Versuch der Isolierung der im Serum gefundenen Proteine direkt aus dem Tumorgewebe erst nach der Etablierung von Methoden, die eine erfolgreiche Identifizierung und Charakterisierung versprachen, begonnen.

Durch Gelfiltrationen an AcA 54 konnten aus Tumorgewebeextrakt (s. 2.3.2) drei Calcitonin-immunreaktive Fraktionen mit Molekulargewichten von 100.000, 48.000 und 20.000 Dalton aufgetrennt werden. Es wurden im wesentlichen die gleichen hochmolekularen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen isoliert, die auch schon im Serum beschrieben werden konnten. Die Fraktion mit dem Molekulargewicht von 100.000 Dalton war jedoch gegenüber der Auftrennung aus dem Serum signifikant vermehrt (Abb. 8). Weiterhin zeigten diese Gelfiltrationen, daß auch aus Tumorgewebe eine Abtrennung von physiologischem Calcitonin nicht möglich war.

3.4. Versuche zur weiteren Auftrennung der durch Gelfiltration gewonnenen Calcitonin-immunreaktiven Proteine in mögliche Untereinheiten

Zur ersten Charakterisierung der durch die Gelfiltration gewonnenen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen war

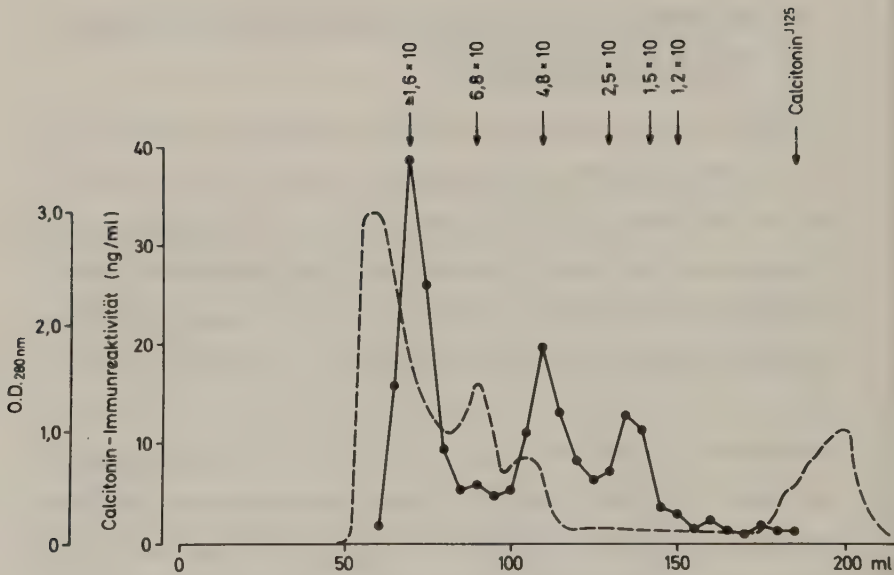


Abb. 8 Calcitonin-immunreaktive Proteine nach Gelfiltration eines Tumorextraktes an AcA 54.

3 ml Tumorextrakt (s. 2.3.2) wurden auf eine AcA 54-Säule (2,5 x 110 cm) aufgetragen und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h (s. 3.1.1) aufgetrennt. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Die Fraktionen wurden vor der Analyse der Calcitonin-immunreaktiven Proteine (●—●) (s. 2.2.1) durch Gefriertrocknung um einen Faktor 10 konzentriert.

es notwendig festzustellen, ob und gegebenenfalls aus welchen Untereinheiten die z.T. recht hochmolekularen Proteine bestehen. Vor weitergehenden Versuchen zur Charakterisierung dieser Proteine sollte vor allem jede unspezifische oder auch spezifische Aggregation von physiologischem Calcitonin mit anderen Serumproteinen geklärt werden. Als Methode der Wahl bot sich die Denaturierung mit Hilfe von SDS und gleichzeitige oder anschließende erneute Proteintrennung nach Mo-

lekulargewichten an (82, 88). Schwierigkeiten bereiteten hier jedoch die äußerst geringen zu identifizierenden Proteinmengen. Bei einer im allerbesten Fall möglichen Ausgangssituation von 100 ng Calcitonin-immunreaktivem Protein/ml Tumorgewebe, bzw. von 5 ng/ml Serum und einem 50 bis 60%igen Verlust bei der Gelfiltration an AcA 54 würde die Konzentration der Calcitonin-immunreaktiven Proteine bei einer erneuten Gelfiltration in Gegenwart von SDS unter die Nachweisgrenze sinken. Aus diesem Grunde wurde die empfindlichere Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach SDS-Denaturierung für die Auftrennung herangezogen. Hier stellte sich jedoch als neues Problem die Nachweismöglichkeit der Calcitonin-Immunreaktivität im Gel. Nachdem die Inkubation des ganzen Gels in einer Lösung radioaktiv oder fluoreszierend markierter Antikörper einerseits aufgrund der hohen Kosten, andererseits wegen der fehlenden Möglichkeit einer quantitativen Konzentrationsangabe ausschied, wurde die unter 2.3.1.8 beschriebene Methode der fraktionsweisen Elution der Calcitonin-immunreaktiven Proteine vom Gel entwickelt. Diese ermöglichte die standardmäßige quantitative Bestimmung im Radioimmunoassay und somit die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Trennungsexperimente.

3.4.1 Optimierung der Methode zum Nachweis von Calcitonin-immunreaktivem Protein nach elektrophoretischer Auftrennung

Radioimmunologische Methoden zum Nachweis von Proteinen in Körperflüssigkeiten besitzen zwar den enormen Vorteil einer hohen Empfindlichkeit bis zu wenigen pg, haben jedoch den entscheidenden Nachteil einer großen Störanfälligkeit dieser Tests. Der Versuch mit Hilfe der von Goltzmann und Tischler 1978 (43) beschriebenen Methode, aus Polyacrylamidgelen Calcitonin-immunreaktives Protein zu eluieren, stieß zunächst auf Schwierigkeiten: Gele wurden zerschnitten, in einem feinen Teesieb zerrieben und anschließend eluiert (s. 2.3.1.8). Es zeigte sich, daß selbst kleinste Gelpartikel, die mit in den Testansatz gelangten, zu falsch-positiven Resultaten führten. Folglich wurde auf das Zerreiben der Gele im Teesieb verzichtet. Jetzt zeigte sich jedoch, daß Bromphenol-Blau sowie SDS oder DTE auch in geringen Konzentrationen den Test erheblich beeinflussen. Langes Auswaschen von Bromphenol-Blau, SDS und DTE mit physiologischer NaCl-Lösung hingegen führte durch die Diffusion von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen aus dem Gel zu falsch-negativen Resultaten. Eine Optimierung der Waschzeit der Gele vor der Elution wurde notwendig (Abb. 9). Die darauffolgende Elution der Calcitonin-immunreaktiven Proteine wurde in einer größeren Menge Testpuffer als für den Testansatz notwendig durchgeführt, um ein unbeabsichtigtes Überführen von

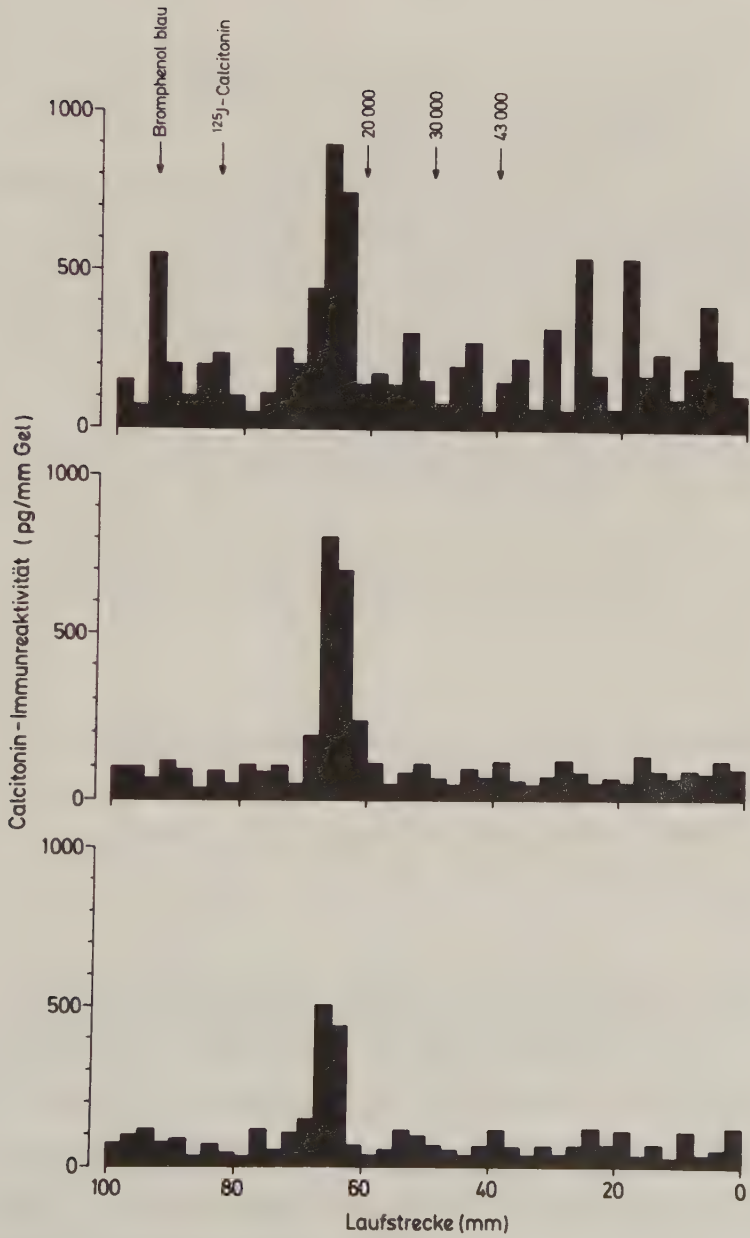


Abb. 9 Optimierung der Waschzeit von SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen zum Nachweis von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen.

Die 20.000 Dalton Calcitonin-immunreaktive Proteinfraction eines Tumorgewebsextraktes wurde nach der Konzentration durch Gefriertrocknung und einer anschließenden 30-minütigen Inkubation bei 56 °C mit SDS und DTE elektrophoretisch aufgetrennt. Unmittelbar nach Beendigung der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Polyacrylamid-Gradientengel in die einzelnen Laufkanäle unterteilt und diese dann unterschiedlich lange mit physiologischer NaCl-Lösung bei 20 °C unter leichtem Rühren gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Gelstreifen in 2,5 mm breite Abschnitte zerschnitten. Die entstandenen Gelstückchen wurden dann mit Boratpuffer 24 Std. unter Schütteln bei 4 °C eluiert (s. 2.3.1.8) und radioimmunologisch auf ihren Gehalt an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen analysiert (s. 2.2.1).

oben - 3 Std. Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung
Mitte - 6 Std. Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung
unten - 12 Std. Waschen mit physiologischer NaCl-Lösung

Gelbröckchen, deren Entstehung beim Zerschneiden der Gele nicht immer ganz vermieden werden konnte, zu verhindern. Eine Variation der Elutionsdauer von 12-48 Stunden hingegen zeigte keinerlei Einfluß auf das Ergebnis des Tests.

3.4.2 Ergebnisse der elektrophoretischen Trennung der Calcitonin-immunreaktiven Proteine aus der Gelfiltration

Die drei durch Gelfiltration von Tumorgewebe, bzw. Seren von Tumorpatienten voneinander getrennten Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen wurden nach Denaturierung in Gegenwart von SDS unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen in einem 12-16 %igen Polyacrylamid-Gradientengel

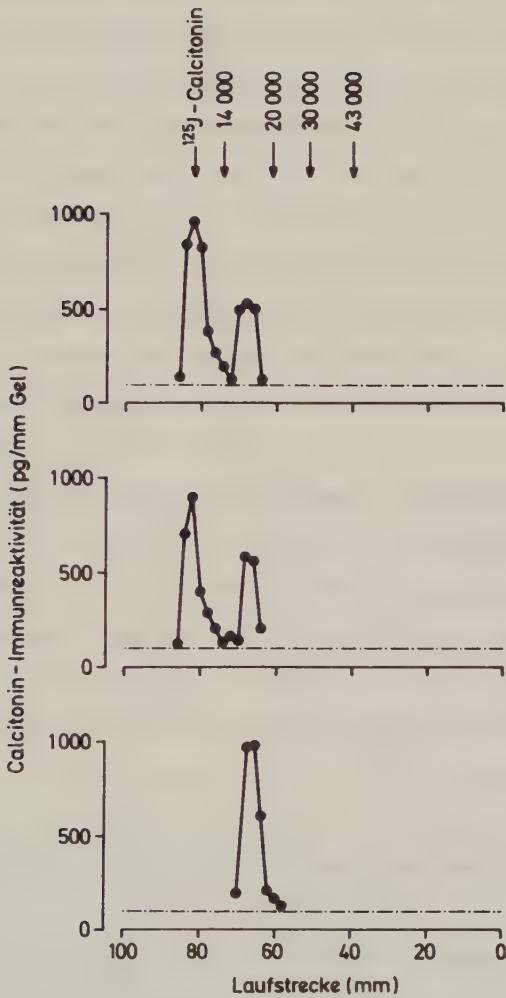


Abb. 10

oben - 100.000 Dalton Fraktion der AcA 54-Säule (3.3)

Mitte - 48.000 Dalton Fraktion der AcA 54-Säule (3.3)

unten - 20.000 Dalton Fraktion der AcA 54-Säule (3.3)

weiter aufgetrennt (2.3.1.8). Die Fraktionen mit Molekulargewichten von 100.000 und 48.000 Dalton wurden zu je zwei Fraktionen mit Molekulargewichten von ca. 17.000 und 3.500 - letzteres das Molekulargewicht von physiologischem Calcitonin - dissoziiert. Die bei einem Molekulargewicht von 20.000 Dalton in der Gelfiltration an AcA 54 retendierende Calcitonin-immunreaktive Proteinfraktion zeigte nach Inkubation mit SDS unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen lediglich eine einzige Calcitonin-immunreaktive Fraktion mit einem apparenten Molekulargewicht von 17.000 Dalton in der Elektrophorese (Abb. 10). Die in der Abb. 10 am Beispiel eines Tumorextraktes gezeigten Verhältnisse konnten ebenso für die aus Serum isolierten Proteinfaktionen gefunden werden. Bedingt durch die niedrigeren Ausgangskonzentrationen im Serum war die elektrophoretische Trennung jedoch nur bei einigen wenigen Seren mit extrem hohen Calcitoninspiegeln, insgesamt nur 12 Patienten, möglich.

Abb. 10 10-15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese der drei hochmolekularen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfaktionen der AcA 54-Säule.

Durch Gefriertrocknung konzentrierte Calcitonin-immunreaktive Proteinfaktionen wurden nach 30 Minuten Inkubation bei 56 °C mit SDS und DTE bzw. ohne DTE elektrophoretisch aufgetrennt. Unmittelbar nach Abschluß der Trennung wurde das Gel in seine einzelnen Laufkanäle zerteilt und die Markerproteine enthaltenden Kanäle mit Serva-Blau 250 R gefärbt.

Das übrige Gel wurde für 6 Std. in 0,9 %iger NaCl-Lösung gewässert. Nach dem Zerteilen der Gelstreifen in 1 mm breite Abschnitte wurden diese in Boratpuffer für 24 Std. unter Schütteln bei 4 °C eluiert (s. 2.3.1.8). Die Eluate dieser Fraktionen wurden radioimmunologisch auf ihren Gehalt an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen analysiert (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen, die einer Calcitoninkonzentration von $70 \text{ pg/ml} \pm 25 \text{ pg/ml}$ entsprach (---).

3.5 Trypsinabbau von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen

Um die Stabilität der Calcitonin-immunreaktiven Proteine gegenüber proteolytischer Aktivität zu untersuchen, wurden Seren von Tumorpatienten, Tumorgewebsextrakte und durch Gel-filtration gewonnene Calcitonin-immunreaktive Proteinfaktionen (s. 2.1.1, 2.3.1.1, 2.3.2) mit Trypsin inkubiert. Diese Abbauxperimente sollten Hinweise darauf erbringen, ob die Verschiebung der Molekulargewichtsverteilung der Calcitonin-immunreaktiven Proteine im Serum von Tumorpatienten gegenüber Tumorgewebsextrakten Ausdruck eines proteolytischen Abbaus während oder nach der Sekretion aus der Zelle sein könnte.

Die Trypsinkonzentration sowie die Inkubationszeit wurde optimiert, indem beide Parameter gerade so gewählt wurden, daß sie unterhalb der Konzentration und Zeit lagen, bei der im immunologischen Test kein Calcitonin mehr nachweisbar war. Nach 6 Std. tryptischer Verdauung wurde diese gestoppt, die Fraktionen mit Hilfe von nativer Polyacrylamid-Gradienten-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Radioimmunoassay analysiert (s. 2.3.4). In Abb. 11 ist das Resultat einer solchen proteolytischen Spaltung des Serums eines Tumorpatienten dargestellt. Ein 6stündiger tryptischer Abbau resultierte in 3 Calcitonin-immunreaktiven Fraktionen mit Molekulargewichten von 48.000 und 20.000 sowie 3.500 Dalton bei einem nahezu vollständigen Abbau der 100.000 Dalton Fraktion. Durch Verlängerung der Inkubationszeiten wurde eine Verschiebung des Proteinmusters zugunsten der 20.000 und 3.500 Dalton Fraktion erreicht.

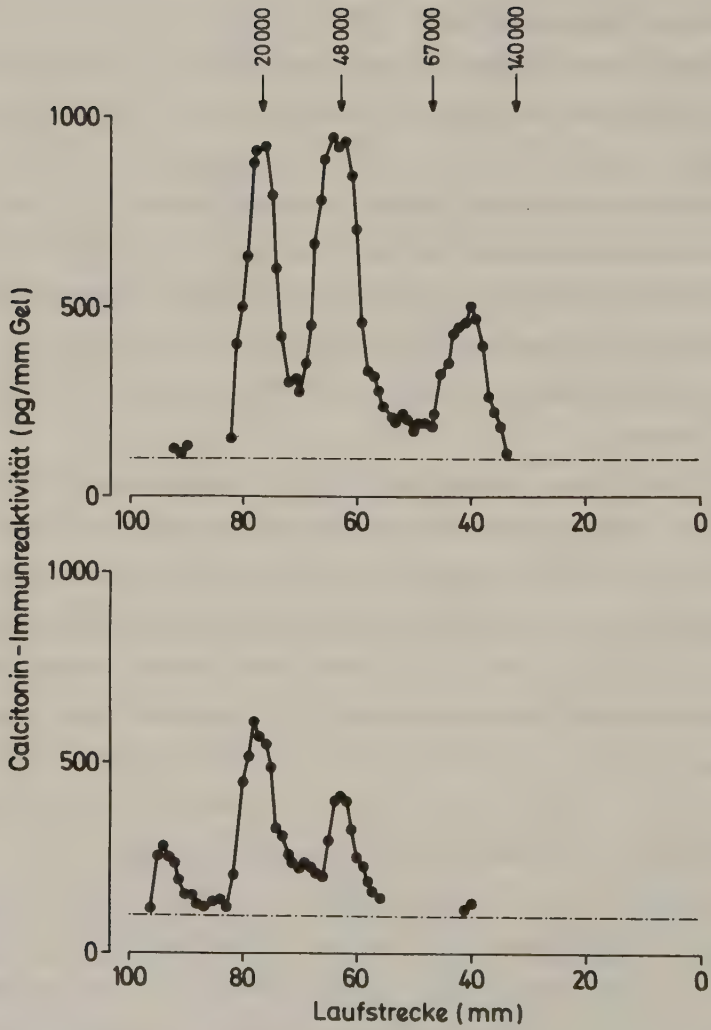


Abb. 11

Abb. 11 Trypsinabbau der Calcitonin-immunreaktiven Proteinfraktionen aus Patientenserum

500 μ l eines Patientensерums wurden für 6 Std. mit 0,3 mg Trypsin bei 4 °C inkubiert. Nach dem Stoppen der Proteolyse mit 1 mg/ml Trypsininhibitor wurde das Serum in einer 10%igen nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Wässern in 0,9 %iger NaCl-Lösung in die Laufkanäle geteilt und diese Streifen in 1 mm breite Abschnitte zerschnitten. Die Gelstücke wurden 24 Std. unter Schütteln bei 4°C eluiert (s. 2.3.1.8) und radioimmunologisch auf Calcitonin-immunreaktives Protein analysiert (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen, die einer Calcitoninkonzentration von 70 pg/ml $\pm$ 25 pg/ml entsprach (---).

- oben - elektrophoretische Auftrennung eines Serums vor Trypsininkubation
unten - elektrophoretische Auftrennung nach 6 Std. Trypsininkubation bei 4 °C

Inkubationen mit Trypsin des durch Gelfiltration gewonnenen 48.000 Dalton Proteins ergaben, daß dieses wesentlich langsamer abgebaut wurde als die Proteinfraktion mit einem Molekulargewicht von 100.000. Kontrollierter Trypsinabbau der 20.000 Dalton Fraktion aus der Gelfiltration (s. 2.3.1.1) war nicht möglich; diese Fraktion blieb unter allen gewählten Inkubationsbedingungen erhalten.

3.6 Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose und Concanavalin A-Sepharose

Um eine mögliche Wechselwirkung von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen mit Immunglobulinen der IgA, IgG und IgM Klassen feststellen zu können, wurde versucht, Seren, Tumorextrakte sowie durch Gelfiltration gewonnene 100.000 Dalton Calcitonin-immunreaktive Proteinfraktionen (s. 2.3.1.1) an Protein A-Sepharose 4b zu binden (2.3.1.3).

Protein A zeigt mit dem Fc-Teil von Immunglobulinen verschiedener Spezies Interaktionen (75), wobei die Antigen-Anti-

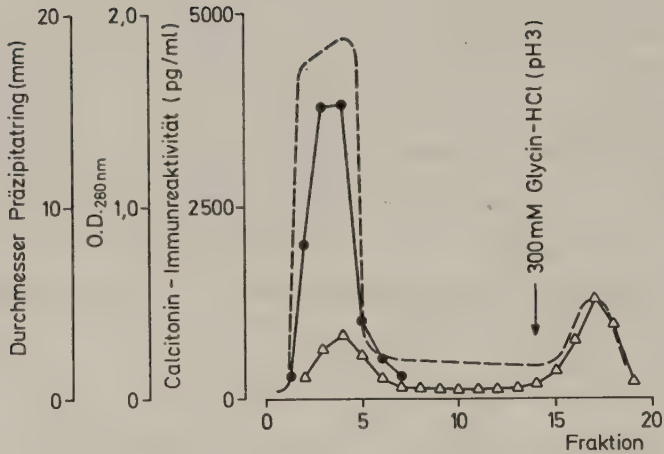


Abb. 12 Affinitätschromatographie von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen an Protein A Sepharose 4B

3 ml Patientenserum wurden auf eine mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8, äquilibrierte Protein A Sepharose Säule mit einem Gelbettvolumen von 2 ml aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Äquilibrationpuffer wurde mit 300mM Glycin-HCl, pH 3, eluiert und das Eluat in 2 ml Fraktionen aufgefangen. In einem 40 µl Aliquot dieser Fraktionen wurde mit Hilfe der radialen Immundiffusion der IgG Gehalt (Δ—Δ) bestimmt (s.2.2.3). Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in allen Fraktionen gemessen. Fraktionen mit einem pH unter 5 wurden mit Hilfe von 0,1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Die danach durch Gefriertrocknung um einen Faktor 10 konzentrierten Fraktionen wurden radioimmunologisch auf ihren Gehalt an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen (●—●) analysiert (s.2.2.1).

körperbindung am Fab-Teil weitgehend unbeeinflusst bleibt. Mit Immunglobulinen assoziiertes Calcitonin-immunreaktives Protein sollte an Protein A gebunden werden. Die Affinitätschromatographie von Patientenseren bzw. von durch Gelfiltration gewonnenen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen mit dem Molekulargewicht von 100.000 zeigte keine Interaktion von Calcitonin-immunreaktivem Material mit Protein A (Abb.12). Das in der Serumprobe enthaltene IgG wurde erwartungsgemäß zum überwiegenden Teil reversibel an Protein A gebunden.

Die drei durch Gelfiltration gewonnenen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen sowie Seren und Tumorextrakte wurden weiterhin durch Affinitätschromatographie an Concanavalin A Sepharose, Lentil Lectin Sepharose und Wheat Germ Lectin Sepharose untersucht, um möglicherweise in den Calcitonin-immunreaktiven Molekülen vorhandene Kohlenhydratanteile zu erfassen. Bei den Lectinen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die die Fähigkeit besitzen, reversibel mit verschiedenen Zuckern zu reagieren (76-79). Keines der verwendeten Lectine konnte jedoch signifikante Mengen von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen binden.

3.7 Ionenaustauschchromatographie von Calcitonin-immunreaktivem Protein

Ionenaustauschchromatographien von Seren von Lungentumorpatienten sowie von Tumorextrakten und Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen, die durch Gelfiltrationen gewonnen worden waren, wurden durchgeführt, um möglicherweise ein schnelles und effektives Anreicherungsverfahren eta-

blieren zu können. Zudem sollten die Calcitonin-immunreaktiven Proteine durch ihr Verhalten an Ionenaustauschergelen charakterisiert werden (90). Es zeigte sich bei neutralem pH und niedrigen Ionenstärken (50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4) eine reversible Bindung von Calcitonin-immunreaktivem Protein an Anionenaustauschergele (DEAE-Sephacel). Die Elution der gebundenen Proteine war sowohl durch einen pH-Sprung in den leicht sauren Bereich (Abb. 13), wie auch durch Erhöhen der Ionenstärke (750 mM NaCl) möglich (Abb. 14). Ionenaustauschchromatographien von Seren und Tumorextrakten führten zu den gleichen Ergebnissen. Durch Gelfiltrationen gewonnene Calcitonin-immunreaktive Proteinfraktionen (s. 3.1, 3.3) zeigten ein unterschiedliches Bindungsverhalten (Tab. 3).

Tab. 3

Ionenaustauschchromatographie der drei durch Gelfiltration gewonnenen Proteinfraktionen an DEAE-Sephacel

	Durch- lauf	NaCl- Eluat	Gesamtausbeute Durchlauf+Eluat	Anreicherungs- faktor im Eluat
100.000 Dalton Fraktion	ca.70%	ca.10%	80 %	0,2
48.000 Dalton Fraktion	30-50%	30-50%	80 %	1
20.000 Dalton Fraktion	0-10%	80-90%	90 %	6

Die Daten wurden anhand von zwei Tumorextrakten und 12 Patientenserum mit Calcitoninkonzentrationen von 520-5.000 pg/ml ermittelt.

Nur die Calcitonin-immunreaktive Fraktion mit einem Molekulargewicht von 20.000 Dalton band nahezu vollständig an den Anionenaustauscher. Eine Erhöhung der Bindung der Calcitonin-

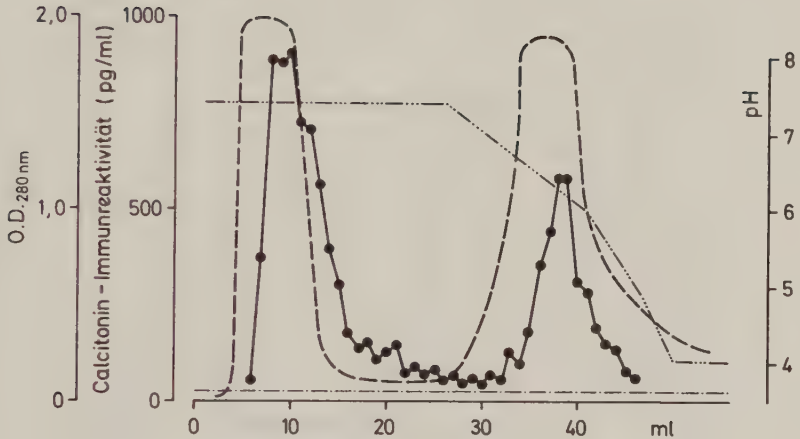


Abb. 13 Ionenaustauschchromatographie von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen aus Patientenserum an DEAE-Sephacel.

3 ml eines Patientenserums wurden auf eine DEAE-Sephacel-Säule mit einem Gelbettvolumen von 5 ml aufgetragen und mit einem diskontinuierlichen pH-Gradienten (---) , pH 7,4 - 4 , eluiert (s. 2.3.1.2). Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in allen Fraktionen gemessen. In den Fraktionen mit einem pH unter 5 wurde der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf einen pH von 7,4 zurückgestellt. Die Fraktionen wurden vor der radioimmunologischen Analyse des Gehaltes an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen (●—●) (2.2.1) durch Gefriertrocknen um einen Faktor 10 konzentriert. Der 10fach konzentrierte Elutionspuffer tauschte im immunologischen Test geringe Calcitoninkonzentrationen vor (·-·-·).

immunreaktiven Proteine durch ein weiteres Senken der Ionenstärke oder eine pH-Verschiebung bis auf einen pH von 8,5 war nicht möglich (s. 2.3.1.2).

Keine der Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen, weder aus Serum von Lungentumorpacienten noch aus Tumor-

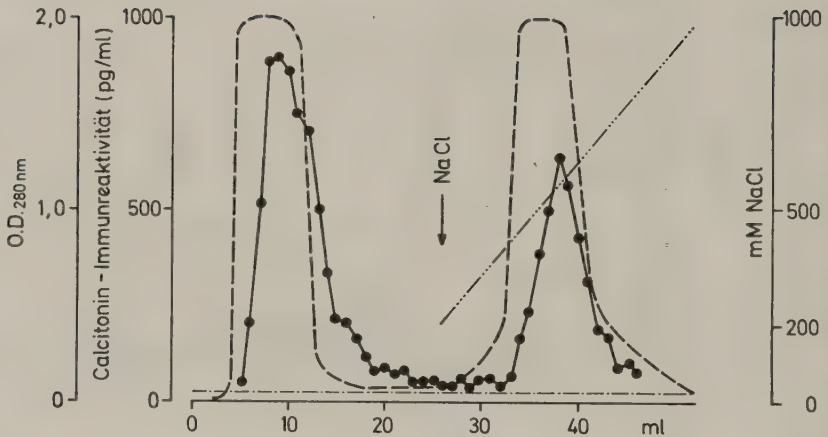


Abb. 14 Ionenaustauschchromatographie von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen aus Patientenserum an DEAE-Sephacel.

3 ml eines Patientenserums wurden auf eine DEAE-Sephacel-Säule mit einem Gelbettvolumen von 5 ml aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten (---), 0,2 bis 1 M, eluiert (s. 2.3.1.2). Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in allen Fraktionen gemessen. Die Fraktionen der Säule wurden dialysiert (s. 2.3.3) und durch Gefriertrocknen um einen Faktor 10 konzentriert. Der 10fach konzentrierte Elutionspuffer täuschte im immunologischen Test geringe Calcitoninkonzentrationen vor (----). Die Analyse des Gehaltes an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen (●—●) in den einzelnen Fraktionen wurde radioimmunologisch durchgeführt (s. 2.2.1).

gewebsextrakten, zeigte Interaktionen mit einem Kationenaustauschergel (CM 52).

3.7.1. Elektrophoretische Analyse der reversibel an DEAE-Sephacel bindenden Calcitonin-immunreaktiven Proteinfraktionen aus Seren von Lungentumorpatienten

Die durch Gelfiltration gewonnenen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfraktionen zeigten ein unterschiedliches Bindungsverhalten an Ionenaustauschergel. Um zu überprüfen, ob dies auch für die Proteine im Serum von Lungentumorpatienten bzw. in Tumorgewebsextrakten ohne Vorbehandlung uneingeschränkt gilt, wurden die an DEAE-Sephacel bindenden sowie die nicht an DEAE-Sephacel bindenden Proteinfraktionen (s. 3.7) mit Hilfe von 10 %igen und 10-15 %igen Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophoresen unter nativen und denaturierenden Bedingungen untersucht. Eine vollständige Bindung der 20.000 Dalton Fraktion und eine teilweise Bindung der 48.000 Dalton Fraktion konnte bestätigt werden (Abb. 15, vergleiche Tabelle 3). Die hochmolekulare Fraktion mit dem Molekulargewicht von 100.000 zeigte nur eine vernachlässigbar geringe Bindung an das Ionenaustauschergel.

SDS Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophoresen der Eluate und Durchläufe von DEAE-Sephacel Chromatographien von Patientenseren zeigten, daß die an den Anionenaustauscher bindenden Proteine in Gegenwart von SDS in ein 17.000 Dalton Calcitonin-immunreaktives Protein und in ein Calcitonin-immunreaktives Protein mit dem Molekulargewicht von physiologischem Calcitonin gespalten werden können (Abb. 16). Die Proteine des Durchlaufs der Ionenaustauschchromatographie werden dagegen in Gegenwart von SDS bis zum Molekulargewicht von

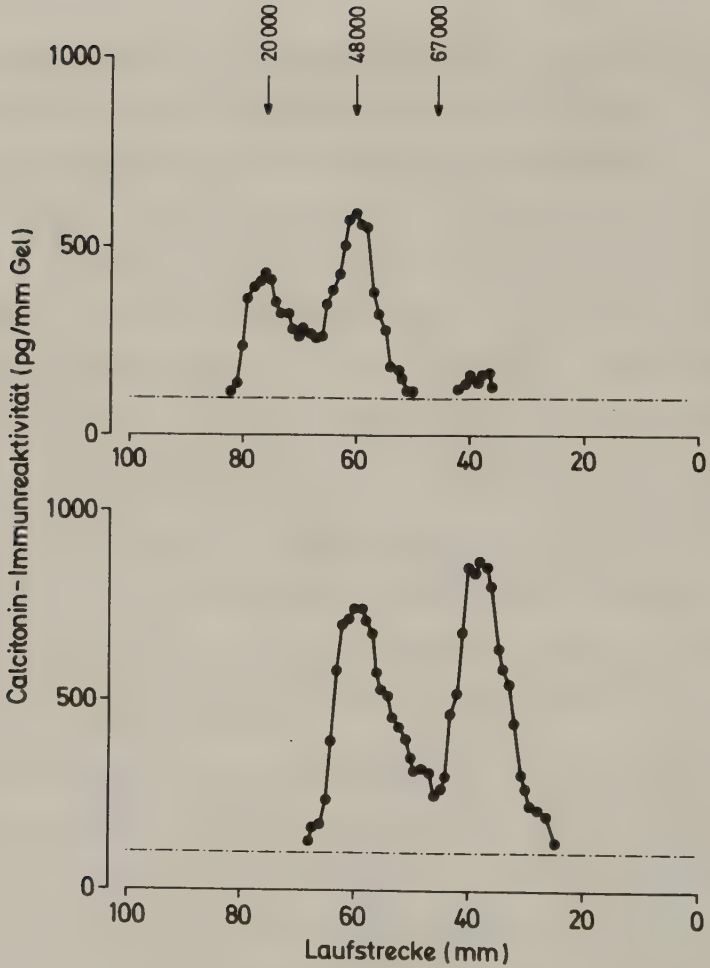


Abb. 15 10 %ige native Polyacrylamidgel-Elektrophorese des Durchlaufes und des Eluats der DEAE-Sephacel-Chromatographie

Durch Gefrierdrehung konzentrierte Fraktionen der DEAE-Sephacel-Chromatographie (s. 2.3.1.2, Abb. 16) wurden unter nativen Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.3.1.8). Das Gel wurde 2 Std. in einer 0,9 %igen NaCl-Lösung gewässert und anschließend in die einzelnen Laufkanäle geteilt. Die Markerproteine wurden sofort mit Servablauf 250 R gefärbt, während die anderen Gelstreifen in 1 mm breite Stücke zerschnitten wurden. Die einzelnen Gelstücke wurden 24 Std. unter Schütteln bei 4 °C

mit 0,1 M Boratpuffer eluiert und der Überstand radioimmunologisch auf Calcitonin-immunreaktives Protein analysiert (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer täuschte im immunologischen Test eine geringe Calcitoninkonzentration vor (-----).

oben - elektrophoretische Auftrennung des Eluates der DEAE-Sephacel-Chromatographie (Abb. 14)

unten - elektrophoretische Auftrennung des Durchlaufes der DEAE-Sephacel-Chromatographie (Abb. 14)

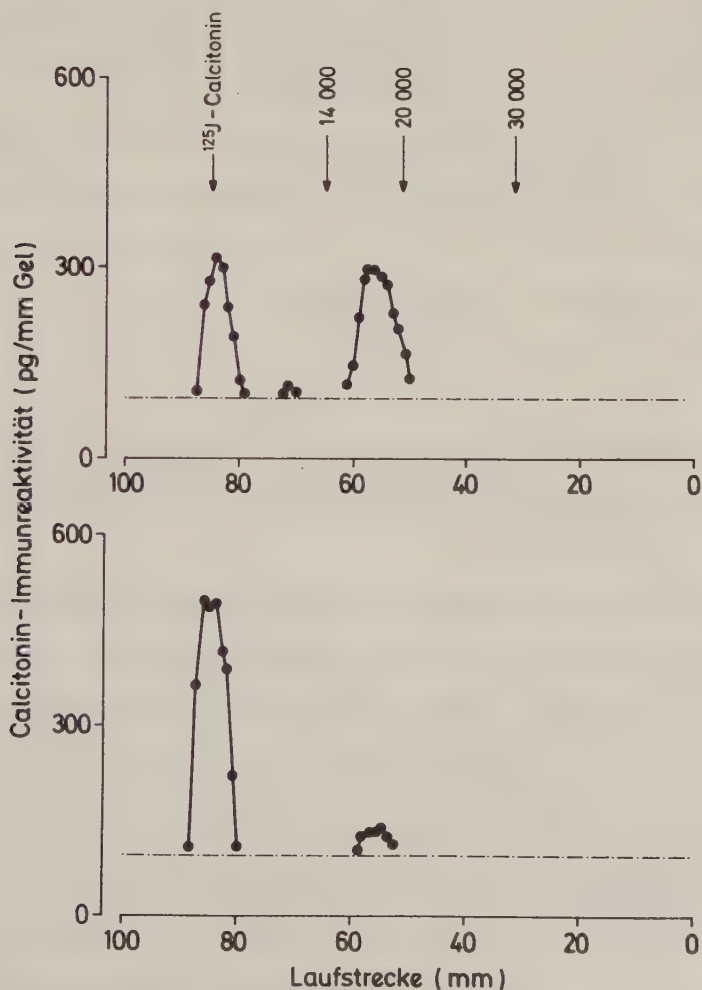


Abb. 16 10-15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese des Durchlaufes und des Eluates der DEAE-Sephacel-Chromatographie.

Durch Gefriertrocknung konzentrierte Fraktionen der DEAE-Sephacel-Chromatographie (s. 2.3.1.2) wurden 30 Minuten bei 56 °C mit SDS und DTE inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (2.3.1.8). Das Gel wurde für 6 Std. in 0,9 %iger NaCl-Lösung gewässert und anschließend in die einzelnen Laufkanäle geteilt. Die Markerproteine wurden sofort mit Servablauf 250 R gefärbt, während die anderen Gelabschnitte in 1 mm breite Scheiben zerschnitten wurden. Die einzelnen Gelstücke wurden 24 Std. unter Schütteln bei 4 °C mit 0,1 M Boratpuffer eluiert und radioimmunologisch auf Calcitonin-immunreaktives Protein analysiert (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer täuschte im immunologischen Test eine geringe Calcitoninkonzentration vor (----).

- oben - elektrophoretische Auftrennung des Durchlaufes der DEAE-Sephacel-Säule (Abb. 14)
- unten - elektrophoretische Auftrennung des Eluates der DEAE-Sephacel-Säule (Abb. 14)

physiologischem Calcitonin gespalten.

3.8. Versuche zur Charakterisierung von Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen aus Seren von Patienten mit Lungentumoren

Aufgrund der statistisch gesehen geringeren Bedeutung der ACTH-immunreaktiven Proteine bei Lungentumorph Patienten (Abb. 1) sollte im Rahmen dieser Arbeit nur eine orientierende biochemische Charakterisierung dieses Proteins durchgeführt werden, um die Voraussetzung zur eingehenderen Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen ACTH-immunreaktivem Protein und Autoantikörpern (46) zu schaffen. Vorversuche (Trypsininkubationen, Inkubationen des Serums bei Raumtemperatur) hatten zudem ergeben, daß es sich bei den ACTH-immunreaktiven Proteinen im Serum von Lungentumorph Patienten um äußerst labile Proteine handelt.

3.8.1 Identifizierung Adrenocorticotropin-immunreaktiver Proteine durch Gelfiltration

Bedingt durch die im Vergleich zum Calcitonin erheblich niedrigeren Serumspiegel von ACTH-immunreaktiven Proteinen bei Patienten mit Lungentumoren (Abb. 1) ist es mit dem bisher zur Verfügung stehenden Nachweisverfahren noch nicht gelungen, ACTH-immunreaktive Proteine durch Gelfiltrationen aus Patientenseren direkt aufzutrennen. Es wurde versucht, diese Seren durch Gefriertrocknung zu konzentrieren. Dies erwies sich jedoch als nicht praktikabel, da beim Resuspendieren der gefriergetrockneten Seren diese verklumpten und nicht wieder vollständig in Lösung gebracht werden konnten. Als erster Schritt zu einer Charakterisierung der ACTH-immunreaktiven Proteine wurde ein affinitätschromatographisches Anreicherungsverfahren angewendet.

3.8.1.1 Polare Chromatographie an Silicagel

In der Literatur wird ein Verfahren zur Extraktion von physiologischem ACTH aus Plasmen und Seren mit Hilfe von Silicagel beschrieben (81). ACTH wird hierbei zunächst in Gegenwart eines polaren Lösungsmittels auf die Säule aufgetragen und dann mit einem Gradienten mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels wieder eluiert (Abb. 17). Aufgrund hoher Proteinverluste und vor allem aufgrund der nicht quantitativen Bindung des im Serum von Lungentumorpatienten vorhandenen Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteins war die

Tab. 4

Anreicherung von ACTH-immunreaktiven Proteinen aus Serum von Patienten mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen durch polare Chromatographie und Affinitätschromatographie			
	Polare Chromatographie an Silicagel	Affinitätschromatographie an Con-A-Sepharose	
Durchlauf	20-30 %	35 %	5-10 %
Eluat	20-30 %	25 %	75-85 %
Ausbeute Durchlauf + Eluat	40-50 %	60 %	90
Anreicherungsputz im Eluat	400	1,5	6

Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 8 Patientenserum mit ACTH-Konzentrationen von 480-1000 pg/ml.

polare Chromatographie nicht als Anreicherungsschritt vor einer Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration geeignet (Tab. 4). Auch durch Erhöhung der Säulenkapazität ließ sich das Ergebnis nicht verbessern.

3.8.1.2 Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose

Da in der Literatur für das bei den tierischen Systemen beschriebene Adrenocorticotropin Vorläufermolekül eine Glykoproteinkomponente beschrieben wird (58), wurde eine affinitätschromatographische Anreicherung an Concanavalin-A-Sepharose versucht (2.3.1.4). Eine Bindung von ACTH-immunreaktivem Protein an das Affinitätsgel wurde beobachtet. Das gebundene Protein konnte mit α -D-Mannose eluiert werden (Abb. 18). Mit Hilfe dieser Affinitätschromatographie konnte somit nachgewiesen werden, daß die im Serum von Lungentumorpatienten zirkulierenden ACTH-immunreaktiven Proteine Glykoproteinkompo-

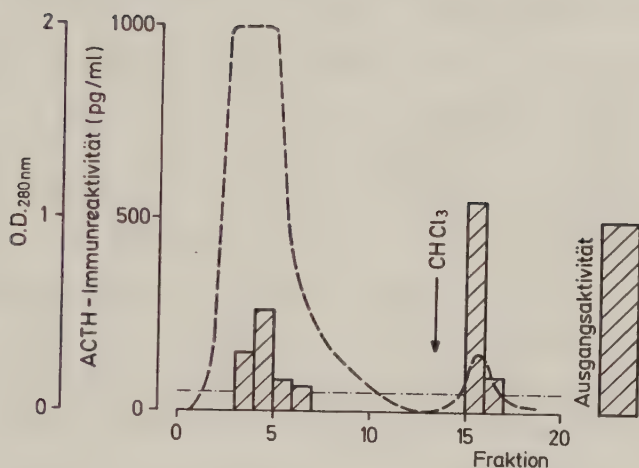


Abb. 17 Polare Chromatographie von ACTH-immunreaktiven Proteinen an Silicagel.

Eine Silicagelsäule mit einem Gelbettvolumen von 1 ml wurde zunächst mit 3 ml Methanol gespült und anschließend mit 8 ml H_2O äquilibriert. Nach dem Auftragen von 2 ml Patientenserum wurde die Säule mit 8 ml 25 mM Natriumphosphatpuffer gewaschen und mit 2 ml Chloroform eluiert. Die Absorption des Proteins wurde bei 280 nm (----) in einer Durchflußküvette gemessen. Die chloroformhaltigen Fraktionen wurden mit Stickstoff zum Trocknen verblasen und in 1 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Der konzentrierte Elutionspuffer täuschte im immunologischen Test geringe ACTH-Konzentrationen (50 pg/ml) $\pm$ 15 pg/ml vor (-.-.-). Durchlauf und Eluat wurden radioimmunologisch auf ihren Gehalt an ACTH-immunreaktiven Proteinen (schraffierte Säulen) analysiert (s. 2.2.1).

nenten enthalten. Als Anreicherungsverfahren für Molekulargewichtsbestimmungen war jedoch auch diese Chromatographie nicht geeignet, wie die in Tab. 4 dargestellten Daten zeigen. Auch eine Steigerung der Säulenkapazität erbrachte keine Verbesserung dieses Ergebnisses.

3.8.1.3 Affinitätschromatographie an Sepharose-Blau

Sepharose-Blau ist eine Sepharose 4b Gelmatrix, an die als Ligand der Farbstoff CIBACRON BLUE F3 GA gekoppelt ist. Cibacron blue F3 GA ist sterisch einem Dinukleotid ähnlich und sollte daher Proteine binden, die eine Dinukleotidfalte besitzen (80, 91). Zusätzlich wird Serumalbumin an den Liganden nahezu vollständig adsorbiert (92). Es sollte versucht werden, mit Hilfe von Affinitätschromatographie an Sepharose-Blau Serumalbumin und einen Teil der anderen Serumproteine zu entfernen, um den Durchlauf der Säule, der die ACTH-immunreaktiven Proteine enthalten sollte, anschließend durch Gefriertrocknung anzureichern (2.3.1.5) (93). Es zeigte sich jedoch, daß die ACTH-immunreaktiven Proteine zu 80-85 % reversibel an den Farbstoff gebunden wurden (Abb. 19, Tab. 4). Das Eluat dieser Affinitätschromatographie konnte nach einer Dialyse (2.3.3) gefriergetrocknet und problemlos resuspendiert werden. Es war möglich, das Eluat in weniger als 5 % seines Ausgangsvolumens vollständig zu resuspendieren. Somit stellte die Affinitätschromatographie an Sepharose-Blau ein geeignetes Anreicherungsverfahren vor einer Molekulargewichtsbestimmung der ACTH-immunreaktiven Proteine durch Gelfiltration dar.

3.8.1.4 Molekulargewichtsbestimmung ACTH-immunreaktiver Proteinfraktionen durch Gelfiltration

Die Gelfiltration an Aca 54 zur Molekulargewichtsbestimmung von ACTH-immunreaktivem Material aus Serum wurde mit den

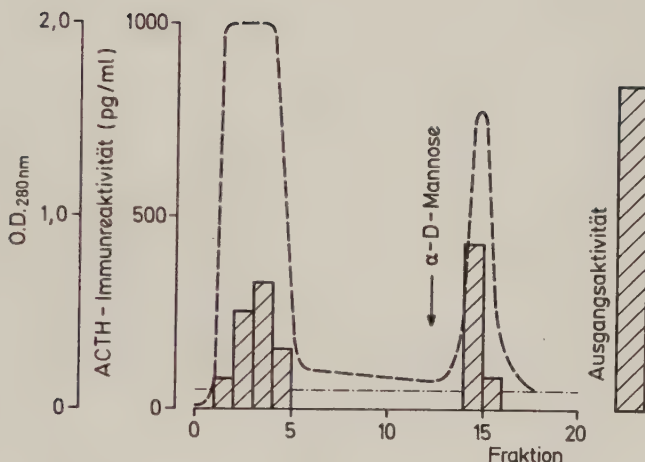


Abb. 18 Affinitätschromatographie von ACTH-immunreaktiven Proteinen an Concanavalin-A-Sepharose-4B

3 ml eines Patientenserums wurden auf eine Concanavalin-A-Sepharose-Säule mit einem Gelbettvolumen von 2 ml aufgetragen, die zuvor mit 25 mM Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3, äquilibriert worden war. Nach dem Waschen der Säule mit dem 5fachen Volumen an Äquilibrierungspuffer wurde mit 10 mM α -D-Mannose eluiert. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (-----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Die 1 ml-Säulenfraktionen wurden unter Vermeidung einer unspezifischen Adsorption von ACTH-immunreaktivem Protein an die Dialyseschläuche (s. 2.3.3) dialysiert. Der Gehalt der Fraktionen an ACTH-immunreaktiven Proteinen (schraffierte Säulen) wurde radioimmunologisch bestimmt (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer täusche im immunologischen Test geringe ACTH-Konzentrationen vor (-----).

Eluaten der Sepharose-Blau-Affinitätschromatographie als Ausgangsmaterial durchgeführt. Es traten reproduzierbar zwei ACTH-Aktivitätsgipfel mit Molekulargewichten von ca. 100.000 Dalton und 30.000 Dalton auf (Abb. 20). Eine Proteinfraktion mit dem Molekulargewicht von physiologischem ACTH wurde durch die Gelfiltration nicht abgetrennt.

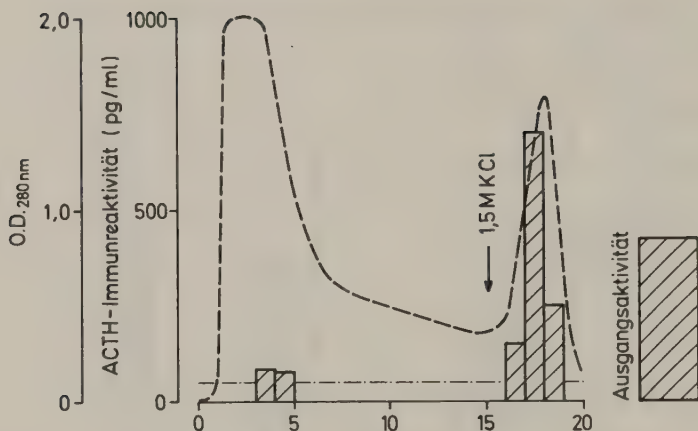


Abb. 19 Affinitätschromatographie von ACTH-immunreaktiven Proteinen an Cibacron blue F3 GA (Blue Sepharose CL 6B).

Die Sepharose-Blau-Säule wurde zunächst zur Vermeidung irreversibler Absorptionen von ACTH-immunreaktiven Proteinen mit einer 1 %igen Rinderserumalbuminlösung in 50 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, abgesättigt. Nachdem reversibel gebundenes Serumalbumin mit einer 1,5 M KCl-Lösung eluiert worden war, wurde die Säule mit dem 10-fachen Volumen an Phosphatpuffer gewaschen. Im Anschluß daran wurden 15 ml Patientenserum auf die Säule aufgetragen und die Säule mit 30 ml 50 mM Phosphatpuffer, 200 mM NaCl gespült. Die reversibel an die Säule gebundenen ACTH-immunreaktiven Proteine wurden mit 1,5 M KCl eluiert (s. 2.3.1.5). Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Die Fraktionen wurden unter Vermeidung von irreversiblen Adsorptionen der ACTH-immunreaktiven Proteine an die Dialyseschläuche dialysiert (s. 2.3.3). Der Gehalt an ACTH-immunreaktiven Proteinen wurde radioimmunologisch analysiert (schraffierte Säulen) (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer tauschte im immunologischen Test geringe ACTH-Konzentrationen vor (-----).

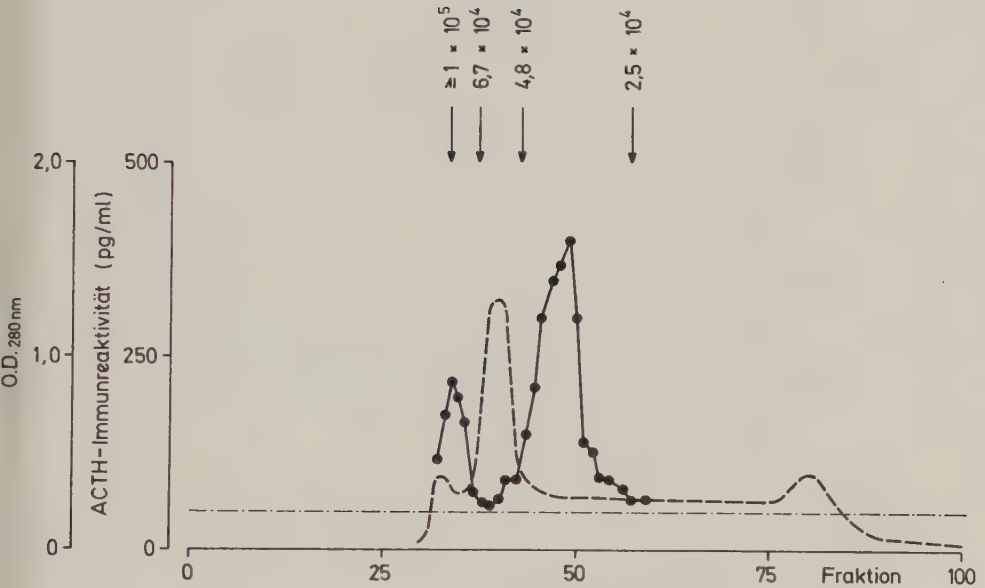


Abb. 20 Auftrennung von ACTH-immunreaktiven Proteinen durch Gelfiltration an Aca 54

Das Eluat der Blue Sepharose CL 6B-Säule (s. Abb. 19) wurde nach der Dialyse gefriergetrocknet, in 1 ml H_2O resuspendiert und auf eine Aca 54-Säule mit einem Gelbettvolumen von $2,5 \times 80$ cm aufgetragen. Die Gelfiltration wurde durchgeführt in Gegenwart von 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, 0,2 M NaCl und Proteaseinhibitoren mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h (s. 2.3.1.1). Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Die Fraktionen wurden radioimmunologisch auf ihren Gehalt an ACTH-immunreaktiven Proteinen (●—●) analysiert (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer täuschte im immunologischen Test geringe ACTH-Konzentrationen vor (---).

3.9 Immunfluoreszenzoptischer Nachweis von Adrenocortico- tropin-immunreaktiven Proteinen in Gefrierschnitten von kleinzelligem Lungentumorgewebe

Für den Nachweis, daß ACTH von den Lungentumorzellen selbst ausgeschüttet und nicht reaktiv auf das Tumorgeschehen am physiologischen Syntheseort gebildet wird, wurde versucht, mit Hilfe der Sternberger Technik (87) in Paraffinschnitten sowie durch indirekte Immunfluoreszenz in frischem Tumorgewebe ACTH-immunreaktive Proteine darzustellen. Abb. 21 zeigt den immunfluoreszenzoptischen Nachweis von ACTH-immunreaktivem Protein im Gewebe eines Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom. Vom Tumor nicht infiltriertes Lungengewebe desselben Patienten zeigte keine Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen ACTH Tumorgewebstücke, die mit Kaninchen γ -Globulin bzw. PBS anstelle von Anti-ACTH- γ -Globulin vom Kaninchen als Kontrollen inkubiert worden waren, wiesen ebenfalls keine Fluoreszenz auf. Untersuchungen mit Hilfe der Sternberger Technik in pathologischem Routinematerial ergaben ebenfalls einen positiven Nachweis von ACTH-Immunreaktivität in Lungentumorgewebe. Aufgrund des relativ groben Fixierungsverfahrens in Paraffin waren die Färbungen jedoch nicht so eindeutig den Zellen zuzuordnen wie bei der Immunfluoreszenz an frischem, unfixiertem Tumorgewebe (94).

3.10 Gelfiltrationen der ACTH-immunreaktiven Proteine aus Tumorextrakten

Tumorgewebsextrakte (s. 2.1.3) konnten ohne vorherige Anreicherungsverfahren durch Gelfiltration an AcA 54 aufgetrennt werden. Die anschließende radioimmunologische Analyse der einzelnen Säulenfraktionen ergab eine Trennung zweier hochmolekularer Adrenocorticotropin-immunreaktiver Proteinfractionen neben einer kleinen Proteinfraction mit einem Molekulargewicht von physiologischem ACTH (4.700) (Abb. 22). Die ACTH-immunreaktiven Proteine mit den Molekulargewichten von ≥ 100.000 und von 30.000 Dalton waren bereits im Serum nachgewiesen worden (Abb. 20). Es konnte nicht geklärt werden, ob die Existenz von physiologischem ACTH neben den hochmolekularen Proteinen in Lungentumorgewebe charakteristisch ist. In dem zweiten, im Rahmen dieser Arbeit analysierten Tumorgewebsextrakt war kein physiologisches ACTH nachweisbar, während die hochmolekularen ACTH-immunreaktiven Proteinfractionen in den gleichen Verhältnissen gefunden werden konnten. Eine Untersuchung weiterer Tumorgewebsextrakte war aus Gründen der schwierigen Materialbeschaffung nicht möglich.

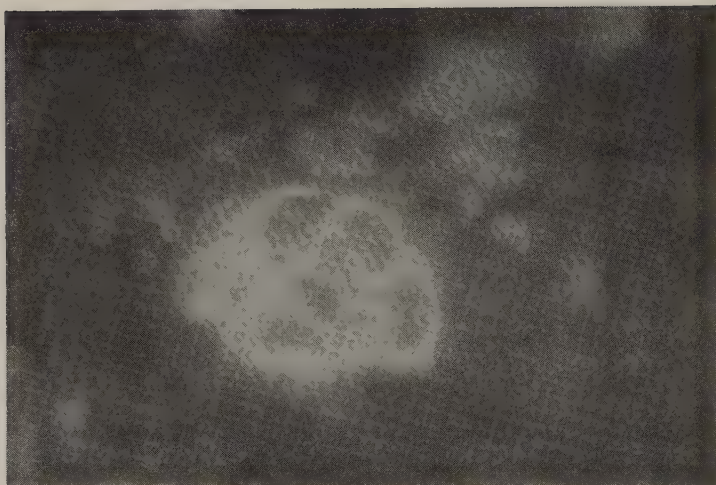


Abb. 21 Nachweis von ACTH-immunreaktivem Protein in Gefrierschnitten von kleinzelligem Lungentumorgewebe durch indirekte Immunfluoreszenz.

Tumorgewebsstücke wurden max. 6 Std. nach Eintritt des Todes entnommen, in 2 x 2 mm große Stücke zerschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Es wurden von diesen Blöcken 6-8 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt, die nach dem Lufttrocknen mit Kaninchen-Antiserum gegen ACTH vom Schwein für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit Fluorescein gekoppelten Antikörpern gegen Kaninchen γ -Globulin überschichtet und erneut für 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Vergrößerung 800 x). Die mitgeführten Kontrollen mit Kaninchen γ -Globulin bzw. PBS anstelle des Antikörpers gegen ACTH zeigten keine Fluoreszenz (2.2.5), (Abb. 7a).

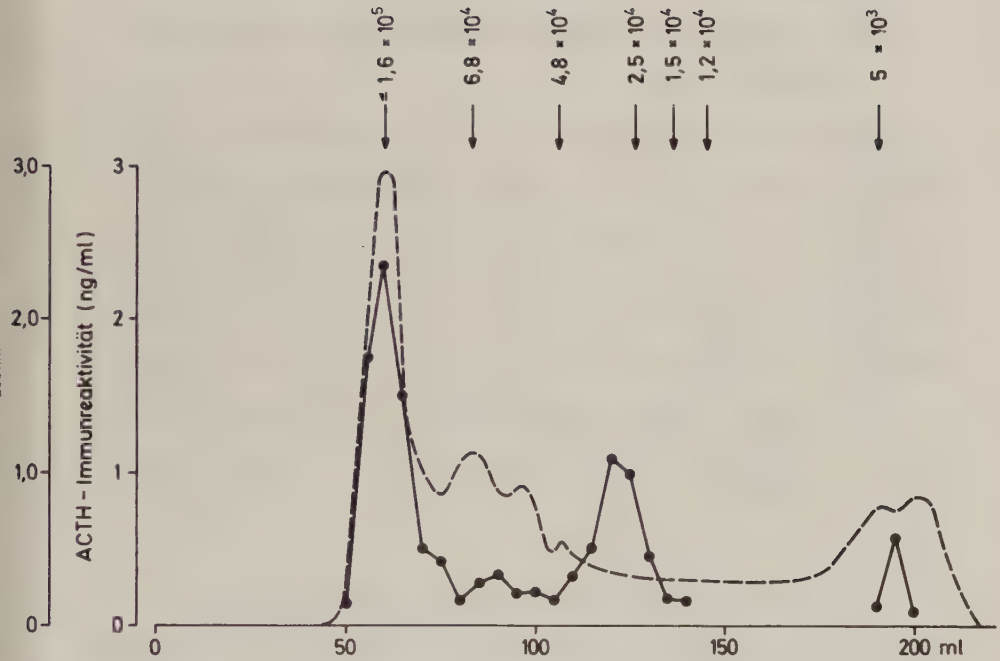


Abb. 22 Auftrennung von ACTH-immunreaktiven Proteinen aus einem Tumorextrakt durch Gelfiltration an Aca 54.

3 ml Tumorextrakt (s. 2.3.2) wurden auf eine Aca 54-Säule (2,5 x 85 cm) aufgetragen. Die Gelfiltration wurde in Gegenwart von 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,4, 0,2 M NaCl und Proteaseinhibitoren mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h (s. 3.1.1) durchgeführt. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Die Fraktionen wurden radioimmunologisch auf ACTH-immunreaktives Protein (●—●) analysiert (s. 2.2.1).

3.11 Charakterisierung von ACTH-immunreaktiven Proteinen als Autoantigen im Serum von Patienten mit kleinzelligen Lungentumoren

In früheren Untersuchungen, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt worden waren (46), konnte ACTH-Immunreaktivität in zirkulierenden Immunkomplexen von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen konnten jedoch nicht klären, ob es sich bei diesem Phänomen um unspezifische Aggregationen zwischen ACTH-immunreaktiven Proteinen und Immunkomplexen oder Immunglobulinen oder um spezifische Immunkomplexe zwischen vom Tumor produzierten ACTH-immunreaktiven Proteinen und Autoantikörpern gegen diese Proteine handelt (95, 96). Zur Vereinfachung der Methode der Isolierung von Immunkomplexen und somit zur Etablierung eines Testverfahrens zur routinemäßigen Bestimmung von Immunkomplexen wurde ein Protein-A-Batchverfahren angewendet. Es wurden 40 Seren von Bronchialkarzinom-Patienten mit serologischen ACTH-Konzentrationen über 100 pg/ml mit Hilfe dieses Verfahrens analysiert. Als Kontrolle dienten 50 Seren von Patienten mit zirkulierenden Immunkomplexen (Clq-Bindungstest, (97)), jedoch ohne ACTH-Nachweis im Serum sowie 40 Seren von gesunden Personen. Die Kontrollen wurden mit 6 verschiedenen synthetischen ACTH-Peptiden bzw. tierischen ACTH-Präparationen bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert, um unspezifische Bindung von ACTH an Serumprotein zu ermöglichen (s. 2.3.1.10). Je 2 ml der Patientenseren bzw. der Kontrollen nach ACTH-Inkubation wurden mit 2 ml an Se-

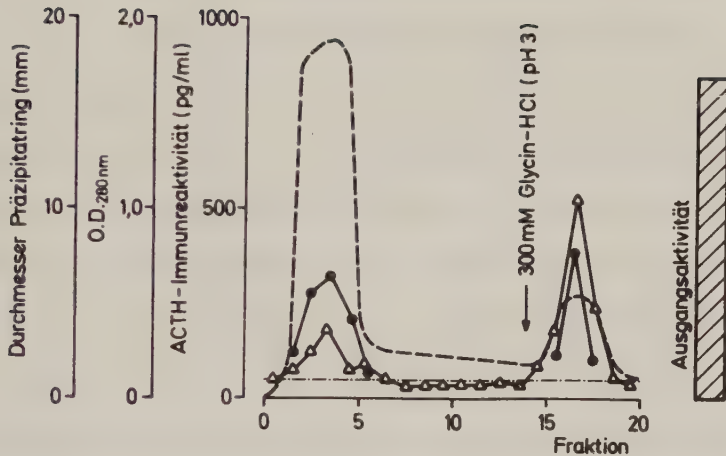


Abb. 23 Affinitätschromatographie von Immunkomplexen an Protein A-Sepharose 4B

3 ml Patientenserum wurden auf eine mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7, äquilibrierte Protein A-Sepharose-Säule (5 x 0,5 cm) aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Äquilierungspuffer wurde mit 300 mM Glycin-HCl, pH 3, eluiert. Durchlauf und Eluat wurden in 2 ml Fraktionen aufgefangen. In einem 40 μ l Aliquot der Fraktionen wurde mit Hilfe der radialen Immundiffusion der IgG-Gehalt ($\Delta \rightarrow \Delta$) bestimmt (s. 2.2.3). In allen Fraktionen wurde die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) gemessen. Fraktionen mit einem pH unter 5 wurden mit Hilfe von 0,1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Der Gehalt der Fraktionen an ACTH-immunreaktivem Protein ($\bullet \rightarrow \bullet$) wurde radioimmunologisch bestimmt (s. 2.2.1). Der Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen, die einer ACTH-Konzentration von 50 pg/ml ($-\cdot-\cdot-$) $\pm$ 20 pg/ml entsprach.

pharose gekoppeltem Protein A 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Gel wurde dreimal 10 Minuten mit Puffer gewaschen. Durch einen pH-Sprung in den sauren Bereich (pH3) wurde das gebundene Protein wieder eluiert. Nach Wiederherstellen eines neutralen pH-Wertes wurden die ACTH-immunreaktiven Proteine im Radioimmunoassay analysiert. 12 der Kontrollseren mit zirkulierenden Immunkomplexen zeigten eine unspezifische Bindung des hinzugefügten ACTH. Um solche unspezifischen Bindungen zu verhindern, wurde die Inkubationszeit (10 Min. bis 4 Std.), die Inkubationstemperatur (4° C, 10° C, 20° C, 37° C), die Ionenstärke (10 mM, 50 mM, 150 mM, 250 mM) und die Ionenart des Inkubationspuffers (Phosphatpuffer, Tris-HCl-Puffer), die Zahl der Waschschrirte (2-8), die Ionenstärke und Ionart des Waschpuffers (s. Inkubationspuffer), der pH des Waschpuffers (von 6-8) und die Dauer der Waschschrirte variiert. Keine Modifikation erbrachte den völligen Ausschluß unspezifischer Bindungen von ACTH an Immunkomplexe. Als nächster Schritt wurde ein säulenchromatographisches Verfahren an Protein A in Mini-Säulen (5 x 0,5 cm) durchgeführt.

Zusätzlich wurde das Säulenmaterial einer 24-stündigen Vorinkubation bei 4° C mit IgG-freiem Normalserum unterzogen. Nur durch die Kombination dieser beiden Maßnahmen gelang es bei den Immunkomplexe enthaltenden Kontrollen die unspezifische Bindung von ACTH an die Komplexe zu unterdrücken. Abb. 23 zeigt ein charakteristisches Beispiel eines Elutionsprofils einer solchen Protein A Mini-Säule bei der Auftrennung eines Patientenserums. Bei den so ermittelten Daten

ist zu beachten, daß in die Berechnung des mengenmäßigen Anteils des an IgG-gebundenen ACTH-immunreaktiven Proteins im Verhältnis zum freien ACTH-immunreaktiven Protein zwei nicht kalkulierbare Faktoren eingehen. Erstens ist nur derjenige Anteil an ACTH immunologisch nachweisbar, der in einer sterisch, für den radioimmunologischen Test günstigen Konfiguration in dem Immunkomplex gebunden ist. Zweitens stellt die hier verwendete Methode einer sauren Elution von der Protein A-Säule eine sehr grobe Aufarbeitungsmethode dar, die zu erheblichen Denaturierungsverlusten führen kann. Es kann also lediglich eine qualitative und keine, bzw. eine nur sehr ungenaue quantitative Aussage über das Vorhandensein von tumorspezifischem ACTH-immunreaktivem Protein in Immunkomplexen gemacht werden.

3.12 Immunaффinitätschromatographie von ACTH-Immunkomplexen an Anti-ACTH-Sepharose

Zur weiteren Charakterisierung der ACTH-Immunkomplexe wurden mit den Eluaten der Protein A-Säulen (s. Abb. 23) immunaффinitätschromatographische Versuche durchgeführt. Abb. 24 zeigt ein Schema des hierzu entwickelten Verfahrens. Die Eluate der Protein A-Säulen wurden an Sepharose 4B immobilisierten Antikörpern gegen physiologisches ACTH chromatographiert. Eine reversible Bindung von Immunglobulinen wurde nur aus den Seren von ACTH-positiven Patienten mit kleinzelligen Bronchial-

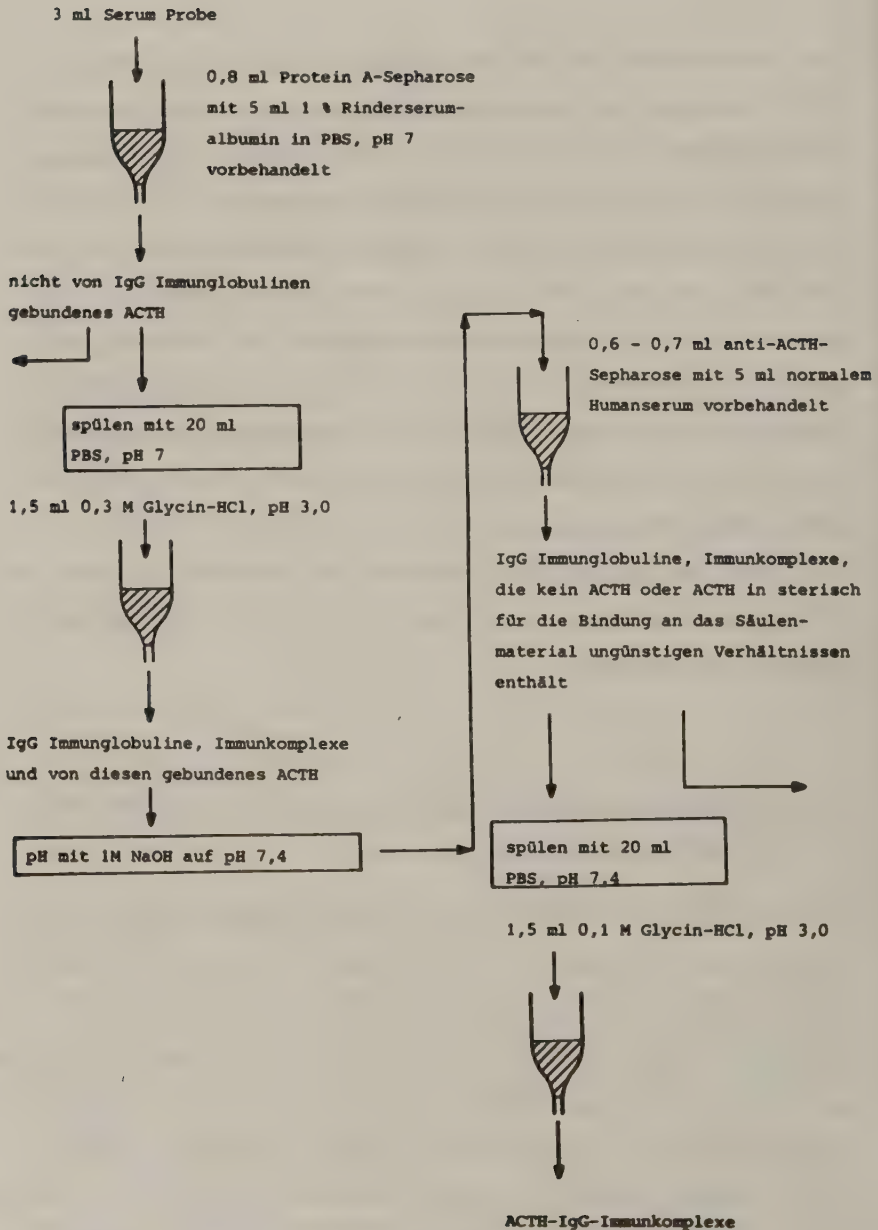


Abb. 24 Schema zum Nachweis von ACTH Anti-ACTH Immunkomplexen im Serum von Patienten mit kleinzelligen Lungentumoren.



Abb. 25 7,5 %ige Polyacrylamid-Gelelektrophorese zum Nachweis von IgG in Eluaten von Anti-ACTH-Immunaффinitätssäulen.

3 ml Patientenserum mit einer ACTH-Konzentration von 500 pg/ml und Nachweis von zirkulierenden Immunkomplexen wurden nach dem in Abb. 24 dargestellten Schema behandelt. Die Eluate der Immunaффinitätssäulen wurden in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen aufgetrennt (s. 2.3.1.8). Sofort

nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel mit Serva-blau 250 R gefärbt.

- 1: Markerprotein: Rinderserumalbumin (MW 67.000), Eialbumin (MW 48.000) und Trypsininhibitor (MW 20.400);
- 2: Serum einer gesunden Kontrollperson;
- 3: Serum eines Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom, das zirkulierende Immunkomplexe enthielt, jedoch keine pathologisch erhöhte ACTH-Konzentration;
- 4: Serum eines Patienten mit zirkulierenden Immunkomplexen und einer pathologisch erhöhten ACTH-Konzentration (500 pg/ml)
- 5: humanes IgG, 99 % rein.

Überschichtungen parallel gelaufener ungefärbter Elektrophoresegele mit einem Anti-IgG enthaltenden Agarosegel zeigten Immunpräzipitat an der gleichen Stelle ($\leftarrow$), die durch die Markerproteine bereits als IgG identifiziert worden war (schematisch).

karzinomen erreicht. Keine Bindung an die immobilisierten Antikörper zeigten die Kontrollgruppen, Patienten ohne Tumorerkrankung sowie Tumorpatienten mit zirkulierenden Immunkomplexen jedoch ohne serologischen ACTH-Nachweis. Abb. 25 zeigt ein natives Polyacrylamidgel, in dem das Eluat einer Anti-ACTH-Sepharose-Chromatographie eines Patientenserums sowie mehrerer Kontrollen aufgetrennt worden ist. Die Proteinfärbung zeigt deutlich, daß lediglich aus dem Protein A-Säulen-Eluat des Patientenserums signifikante Mengen an IgG an den immobilisierten Anti-ACTH-Antikörper gebunden haben. Wurde auf das Polyacrylamidgel ein Antikörper gegen IgG enthaltendes Agarosegel aufgelegt, zeigte sich nach einer 12stündigen Inkubation ein deutliches Immunpräzipitat im Agarosegel an der Stelle, die anhand der Markerproteine als IgG-Position identifiziert worden war. Jedoch auch die Ergebnisse dieser Versuche können nur als indirekter Hinweis einer spezifischen Antigen-Anti-

Körperbindung zwischen ACTH-immunreaktivem Protein und Autoantikörpern angesehen werden.

3.13 Zusammenfassung der Charakterisierung der in den Seren von Lungentumorpatienten zirkulierenden, bzw. aus Tumorgewebe gewonnenen Adrenocorticotropin- und Calcitonin-immunreaktiven Proteine

Tab. 5 gibt einen Überblick über die Eigenschaften der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Calcitonin- bzw. Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteine. Es ist hervorzuheben, daß ein Calcitonin-immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 20.000 bzw. 17.000 Dalton charakterisiert werden konnte. Eindeutige Hinweise für eine Biosynthese dieses Proteins durch die Lungentumorzellen wurden erbracht. Das 20.000 Dalton Molekül ist gegen Trypsin relativ stabil. Es bindet reversibel an Anionenaustauschergele, hat einen isoelektrischen Punkt zwischen 5.5 und 6.0 (90) und besitzt keinen nachweisbaren Glykoproteinanteil. Von Tumorzellen synthetisierte Calcitonin-immunreaktive Proteine stellen einen guten Indikator für die Stoffwechselaktivität des Tumors dar, ohne jedoch autoantigen zu wirken.

ACTH-immunreaktive Proteine, die im Serum von Lungentumorpatienten zirkulieren, ließen sich als zwei Proteinfractionen

CHARAKTERISIERUNG VON CALCITONIN- UND ACTH-IMMUNREAKTIVEN PROTEINEN AUS
SERUM UND GEWEBE VON TUMORPATIENTEN

IMMUNREAKTIVITÄT	GELCHROMATOGRAPHIE ZUR ERMITTLUNG DES MOLEKULARGEWICHTS	PROTEIN A AFFINITÄTS-CHROM.	LECTIN-CHROMATOGRAPHIE	IONENAUSTAUSCHCHROMATOGRAPHIE	SDS-STABILITÄT	STAB. GEGEN-ÜBER PROTEOLYSE	ISOELEK. PUNKT
CALCITONIN	100.000 48.000 20.000	KEINE INTER-AKTION MIT IMMUNGLOBULIN	KEINE GLYKOPROTEINKOMPONENTE	SPEZIF. ANREICH. DER 20.000 DALTON FRAKTION	ABBAU ZU 17.000 DALTON COREPROTEIN	17.000 DALTON PROTEIN HÖCHSTE STABIL.	5,5 - 6,0
ACTH	100.000 30.000	BINDUNG VON IGG IMMUNGLOBULIN	GLYKOPROTEINKOMPONENTE	KEINE BINDUNG	IMMUNOLOGISCH NICHT MEHR NACHWEISBAR	ÄUßERST LABIL	-

Tab. 5

mit Molekulargewichten von ≥ 100.000 und 30.000 Dalton identifizieren. Diese Proteine besitzen kaum Stabilität gegenüber proteolytischen Aktivitäten. Sie lassen sich aufgrund der niedrigen Konzentrationen im Patientenserum nicht näher charakterisieren. Diese Proteine binden nicht an Ionenaustauscher, jedoch quantitativ an Cibacrom Blue F3 GA. Durch Affinitätschromatographie an Concanavalin A-Sepharose ließ sich eine Glykoproteinkomponente in den Proteinen zeigen. Die ACTH-immunreaktiven Proteine sind

ein guter Indikator für die Stoffwechselaktivität des Tumors, darüber hinaus zeigen sie autoantigene Eigenschaften und sind in zirkulierenden Immunkomplexen nachweisbar.

Eine weitere Charakterisierung sowie die Immunisierung von Tieren zur Gewinnung von Antikörpern gegen die spezifischen Tumorproteine zum Zweck der Etablierung immunologischer Tests würde eine Reinigung der Proteine in größerem Maßstab erfordern. Um den in der Beschaffung von geeignetem Ausgangsmaterial liegenden Engpaß zu umgehen, wurde versucht, permanente Tumorzelllinien zu etablieren. Anhand solcher Tumorzelllinien sollte zusätzlich der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Synthese von Calcitonin und ACTH-immunreaktiven Proteinen im wesentlichen für kleinzellige Bronchialtumoren charakteristisch ist oder ob sie ein für Lungentumoren allgemeingültiges Phänomen darstellt.

3.14 Etablierung von permanenten Tumorzelllinien

Permanente Tumorzelllinien können grundsätzlich aus bei Bronchoskopien gewonnenen Tumorgewebsstücken, aus operativ entferntem Tumorgewebe, aus Körperflüssigkeiten (Pleura-, Pericardergüsse und Aszites), Beckenkammstanzen sowie postmortal entnommenem Tumormaterial gewonnen werden (83, 98).

Zur Etablierung von permanenten Tumorzelllinien stehen prinzipiell zwei Methoden zur Auswahl. Zum einen die direkte in vitro Kultur, zum anderen die Xenotransplantation in immuninkompetenten Nagetieren (Abb. 26) (83, 99, 100).

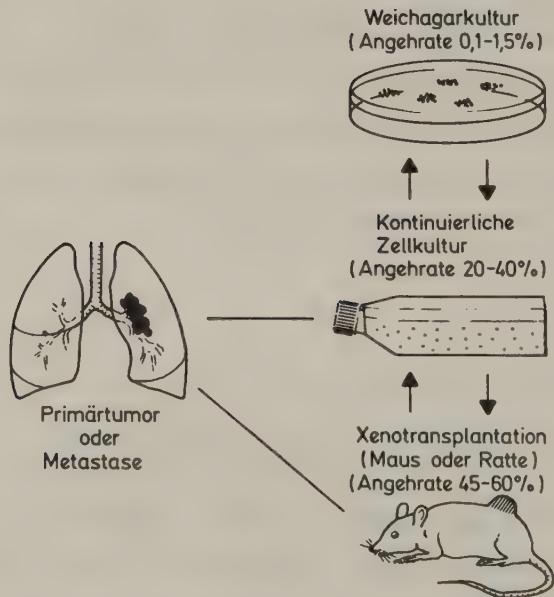


Abb. 26 Schematische Gegenüberstellung der grundsätzlichen Möglichkeiten der Etablierung permanenter Tumorzelllinien.

3.14.1 Versuche zur Etablierung von Tumorzelllinien in nackten Mäusen und Ratten

Als erstes wurde versucht, bronchoskopisch gewonnenes Tumormaterial in nackte Mäuse zu implantieren. Tumorgewebsstücke, die bei diagnostischen Bronchoskopen gewonnen werden, werden bei ihrem Weg durch die Trachea stark mit Keimen kontaminiert, so daß für dieses Tumormaterial eine Implantation in nackte Nagetiere als Methode der Wahl erschien. Die bislang dazu unternommenen Versuche schlugen jedoch alle fehl. Aus keinem einzigen der bronchoskopisch entnommenen Tumorgewebsstücke entwickelte sich ein proliferierender Tumor in der Maus.

In weiteren Versuchen wurde postmortal entnommenes Tumorgewebe den Mäusen implantiert. Von zwei Autopsiefällen wurden enzymatisch desintegrierte Tumorgewebsstücke nackten Mäusen subcutan injiziert. Bei einer dieser Mäuse bildete sich nach 10 Wochen ein Tumor aus, der sich jedoch nach Inkulturnahme und einer Chromosomenanalyse als durch die Implantation von menschlichem Tumorgewebe induzierter Mäusetumor herausstellte.

Bei chirurgisch entnommenem Tumorgewebe gelang es mehrfach, Tumore auf nackten Mäusen zu kultivieren, einer dieser Tumore konnte inzwischen mit Erfolg in die kontinuierliche Zellkultur überführt werden. Es handelt sich hierbei um ein Adenokarzinom, das bei der direkten in vitro Kulturnahme nach 8 Passagen abgestorben war.

Während eines Arbeitsaufenthaltes im Wallenberg-Laboratorium an der Universität Lund in Schweden gelang es, durch Injektion

von 0,5 ml einer mesenchymalen Lungentumorzellsuspension in die Nackenhaut von 5 bis 8 Wochen alten Ratten einen schnell wachsenden Tumor zu etablieren, der bei drei der fünf Ratten bereits nach 8 Tagen einen Durchmesser von ca. 8 mm aufwies. Tumore, die auf diese Weise bis zu einem Gewicht von 80 g herangewachsen waren, konnten ohne Probleme nach einer mechanischen oder enzymatischen Disintegration der Zellen in Kultur genommen werden.

Trotz dieser Erfolge wurde zur Charakterisierung der von Tumorzelllinien produzierten Peptidhormone im wesentlichen der Weg der direkten in vitro Kultur beschritten, da auf diese Weise die gewünschten qualitativen Aussagen über die Peptidhormonbiosynthese wesentlich schneller erarbeitet werden konnten.

3.14.2 Etablierung von permanenten Tumorzelllinien aus chirurgisch gewonnenem Material

Die Etablierung von Tumorzelllinien aus bronchoskopisch gewonnenem Tumorgewebe sowie aus Autopsiematerial scheiterte an der Unsterilität des Gewebes. Bei den aus operativ entnommenem Tumorgewebe etablierten Tumorzelllinien handelt es sich bisher ausschließlich um nichtkleinzellige Lungentumoren, da heute kleinzellige Lungentumoren nur noch in seltenen Fällen operiert werden (s. Einleitung).

Es wurde versucht, nach Möglichkeit noch im Operationssaal Tumorgewebsstücke unmittelbar nach der Entnahme durch den Chirurgen in Kulturmedium zu überführen, um ein Absterben von Tumorzellen zu verhindern. Dieses Vorgehen war jedoch nur in einigen wenigen Fällen möglich, bei denen der Tumor peripher in einem der Lungenlappen lag. In den meisten Fällen lagen jedoch der Tumor bzw. seine regionären Metastasen zentral in der Nähe des Hauptbronchus, was dazu führte, daß nach dem Abtrennen des vom Tumor befallenen Areals von der Zirkulation bis zur vollständigen Herausnahme des Operationspräparates eine längere Zeit verging. Zusätzlich war durch die Schwierigkeiten der Beurteilung der Radikalität der Operation in solchen Fällen ein Transport der entfernten Lungensegmente unter möglichst sterilen Bedingungen zum Pathologen notwendig. Erst dort wurden die Tumorgewebsstücke entnommen, die für eine sichere pathologische Diagnose nicht benötigt wurden. Dieses langwierige Verfahren führte zu einer geringen Ausbeu-

te an lebenden Tumorzellen. Um weitere Verluste zu vermeiden, mußte bei der mechanischen Zerkleinerung des Tumorgewebes darauf geachtet werden, mit zwei gekreuzten sterilen und scharfen Skalpelln gegeneinander zu schneiden und keinesfalls hierfür eine Pinzette zu verwenden, da dabei durch Quetschen des Gewebes zu viele Zellen verlorengehen würden. Es zeigte sich, daß die anschließende enzymatische Desintegration um so erfolgreicher war, je kleiner die Tumorgewebsstücke vorher geschnitten worden waren. Auch eine möglichst vollständige präparative Entfernung von anhaftendem Bindegewebe erwies sich als bedeutungsvoll, da sonst ein zu starkes Fibroblastenwachstum zu einem Überwuchern der Tumorzellen führen konnte. Zur Desintegration der Zellen aus dem Gewebsverband standen die mechanische Methode, d.h. ein Durchstreichen des Tumorgewebes durch ein feines Sieb sowie die enzymatische Methode durch Kollagenase und/oder Trypsin zur Auswahl. Bei enzymatischer Desintegration war die Ausbeute an lebenden Zellen höher. Desweiteren zeigte sich, daß ein Großteil der operativ entfernten Tumoren stark nekrotische Bezirke aufwies, die z.T. nahezu die Festigkeit von Knochen erreichten, so daß eine mechanische Desintegration nicht mehr möglich war. Das Gewebe wurde zunächst mit Kollagenase desintegriert, da sich gezeigt hatte, daß mit diesem Enzym die für die Zellen schonendste Herauslösung aus dem Gewebsverband erreicht wurde, während bei den mit Trypsin desintegrierten Zellen ein großer Teil schon lichtmikroskopisch erkennbare Beschädigungen aufwies. Darüber hinaus wuchsen die durch Kollagenasedesintegration vereinzelter

Zellen erheblich besser an. Trotz der Nachteile der Trypsinbehandlung wurde zur Steigerung der Ausbeute an lebenden Zellen im Anschluß an eine dreimalige enzymatische Desintegration mit Kollagenase noch eine dreimalige enzymatische Desintegration mit Trypsin durchgeführt (s. 2.3.4). Weiter erwies es sich als notwendig, die Anzahl der Tumorzellen pro ml Kulturmedium auf 1×10^5 einzustellen, da bei einer zu geringen Zelldichte die Kulturen nicht anwuchsen. Eine zu hohe Zellzahl hatte dagegen den Nachteil, daß es nicht mehr möglich war, im Phasenkontrastmikroskop das Wachstum der Zellkulturen sicher zu kontrollieren, zumal in der Kultur offensichtlich eine zu große Zelldichte einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum ausübte.

Da histologische Untersuchungen gezeigt hatten (94), daß im Tumorgewebsverband nicht alle Tumorzellen Peptidhormone produzieren, wurde versucht, die peptidhormonsynthetisierenden Tumorzellen durch Klonierung anzureichern. Dies geschah durch Subklonierung solcher Klone, in deren Kulturmedien im Radioimmunoassay Peptidhormon-immunreaktive Proteine identifiziert werden konnten. Dabei gelang es gleichzeitig, die Tumorzellkulturen von kontaminierenden Zellen (Fibroblasten) zu befreien. Abb. 27 zeigt ein Schema des routinemäßigen Vorgehens bei der Etablierung von permanenten Tumorzelllinien aus chirurgisch gewonnenem Tumorgewebe. Es wurde bisher an 22 Fällen der Versuch unternommen, aus chirurgisch entnommenem Tumorgewebe permanente Tumorzelllinien zu etablieren. Bei 8 Tumoren konnten zunächst Tumorzellkulturen etabliert werden, die auch über

Etablierung von permanenten Tumorzelllinien

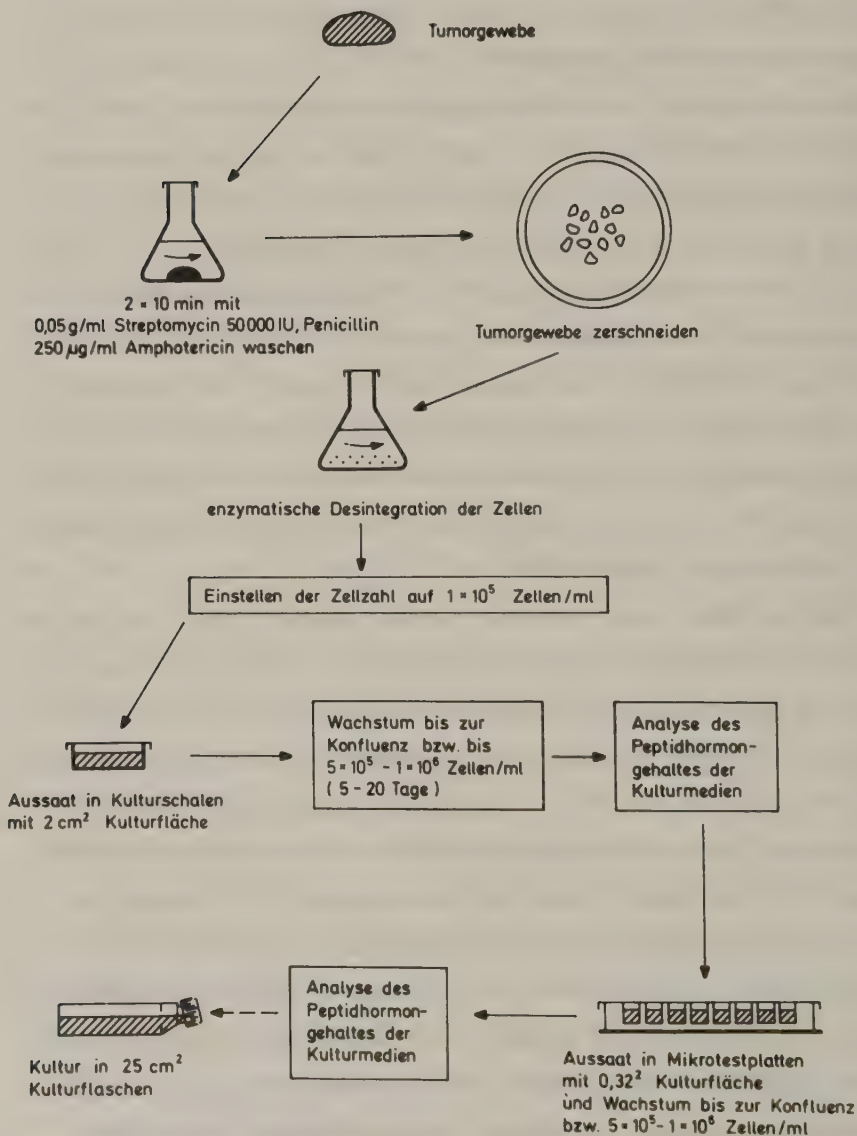


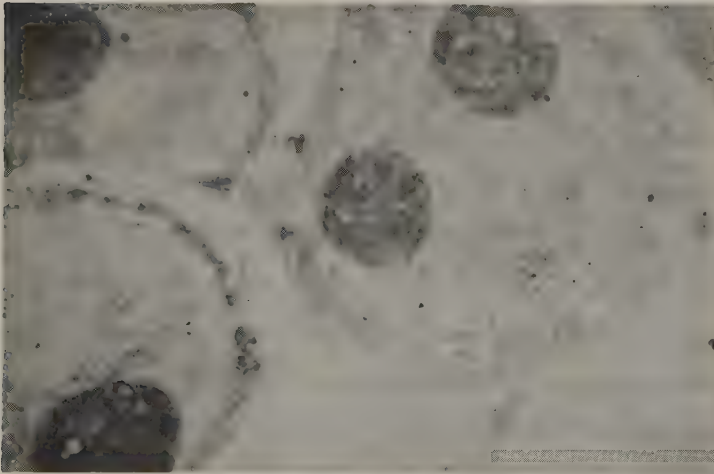
Abb. 27 Schema der Etablierung permanenter Tumorzelllinien aus chirurgisch gewonnenem Tumormaterial.

3 bis 10 Passagen hinweg ein gutes Wachstum zeigten, zwei dieser Kulturen sezernierten Adrenocorticotropin-immunreaktives Protein ins Medium (bis 1.000 pg/ml Medium). Nach maximal 10 Passagen stellten sie jedoch das Wachstum ein und in 5 von 8 Fällen starben sie ab. Die verbleibenden drei Kulturen enthielten bis zu 12 Monaten lebende Zellen, ohne jedoch nennenswertes Wachstum zu zeigen. Von den verbleibenden 11 etablierten Zellkulturen sind einige nunmehr über 30 Passagen hinweg stabil, so daß sie als permanente Zelllinien bezeichnet werden können (Abb. 28 und 29). Abb. 28 A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme einer in Suspension wachsenden Plattenepithelzelllinie. Abb. 28 B zeigt ein Cytozentrifugenpräparat nach Pappenheim-Färbung derselben Plattenepithelzelllinie. Der deutliche Größenunterschied zwischen der Plattenepithel- und der kleinzelligen Lungentumorzelllinie ist klar erkennbar. Auffällig ist in Abb. 28 B die für Tumorzellen typische gelockerte Kernstruktur und das aufgelockerte Cytoplasma (101).

In Abb. 29 A ist eine adhärent wachsende großzellige Lungentumorzelllinie im Phasenkontrastbild dargestellt. Morphologische Unterschiede zu den kleinzelligen und plattenepitheloiden Zelllinien sind offensichtlich. Besonders auffällig ist das für Tumorzellen typische "criss-cross" Wachstum. Der Größenvergleich zwischen dieser und der in Abb. 28 A dargestellten Zell-



A



B

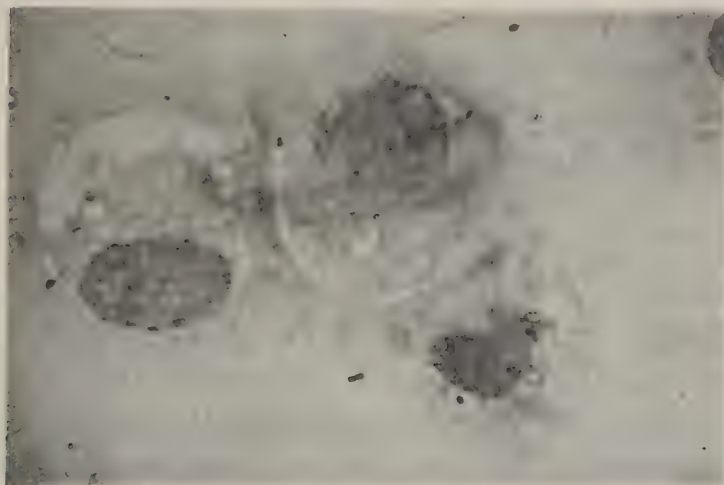
Abb. 28 Kultur einer Plattenepithelzelllinie aus einem Lungentumor

A: Phasenkontrastaufnahme der in Suspension wachsenden Tumorzellen. Die Zellen zeigen eine kugelförmige Gestalt und eine deutliche Granulierung (Vergrößerung 40 x).

B: Cytozentrifugenpräparat nach Pappenheim-Färbung (s. 2.2.6) derselben Zellkultur. Die Zellen zeigen deutlich die für Tumorzellen typische gelockerte Kernstruktur und das im Präparat vakuolisiert erscheinende Cytoplasma (Vergrößerung 400 x).



A



B

Abb. 29 Kultur einer großzelligen Lungentumorzelllinie

A: Zellen einer großzelligen Lungentumorzelllinie, die auf dem Boden des Kulturgefäßes ausgebreitet und angeheftet wachsen. In dieser Wachstumsphase (ca. 7 Tage vor Erreichen der Konfluenz) zeigen die Zellen das für Tumorzellen typische "criss-cross" Wachstum (Vergrößerung 40 x).

B: Zellen derselben Zelllinie im Cytozentrifugenpräparat nach Pappenheim-Färbung (s. 2.2.6). Auffällig ist die für Tumorzellen typische gelockerte Kernstruktur und das im Präparat vakuolisiert erscheinende Cytoplasma (Vergrößerung 400 x).

kultur, kann allerdings nicht ohne weiteres durchgeführt werden, da ausgebreitet wachsende Zellen immer erheblich größer erscheinen als abgekugelte in Suspension wachsende Zellen. Wird jedoch mit einer adhärent wachsenden kleinzelligen Lungentumorzelllinie (Abb. 32 B) ein Größenvergleich gezogen, tritt der Unterschied wieder deutlich hervor.

Abb. 29 B zeigt ein Cytozentrifugenpräparat derselben großzelligen Zelllinie. Wieder zeigt das Cytozentrifugenpräparat die für Tumorzellen typische gelockerte Cytoplasma- und Kernstruktur.

3.14. Etablierung von permanenten Tumorzelllinien aus malignen Ergüssen

Im Verlauf einer malignen Tumorerkrankung kommt es gelegentlich zu Ergüssen von Blutultrafiltrat in Körperhöhlräume. Die Ergüsse stellen ein gutes Ausgangsmaterial zur Etablierung von Tumorzelllinien dar, da sie absolut steril sind und die in ihnen befindlichen Tumorzellen bereits an das Wachstum in Suspension adaptiert sind. Es stören jedoch die in hoher Zahl vorhandenen Erythrozyten, die häufig über 95 % der Zellen eines malignen Ergusses ausmachen können, sowie Epithelzellen.

Abb. 30 zeigt eine schematische Darstellung der Anreicherung von Tumorzellen aus einem malignen Pleuraerguß. Es ist unbedingt notwendig, eine ausreichende Menge an Natriumci-

trat in die Abnahmegefäße vorzulegen, um eine Gerinnung der Körperflüssigkeit zu verhindern, die zu hohen Zellverlusten führen würde. Die Ergüsse wurden nach Möglichkeit direkt bei der Abnahme in sterile 50 ml-Zentrifugenbecher abgefüllt und eine Stunde bei 1 xg sedimentiert. Während dieser Zeit wurde eine Cytdiagnostik durchgeführt. Beim Nachweis von Tumorzellen im Erguß wurde abzentrifugiert und die u.a. die Tumorzellen enthaltende den Erythrocyten aufsitzende Zellfraktion abgehoben. Von diesen Zellen wurde erneut eine Cytdiagnostik durchgeführt und diese danach auf einen 4 °C kalten Ficollgradienten aufgetragen und zentrifugiert. Dabei sammelten sich die Erythrocyten unterhalb des Gradienten, während Tumorzellen, Lymphocyten, Makrophagen und Epithelzellen sich bei einer Dichte von ca. 1,077 sammelten. Geschädigte Zellen und Fettzellen schwammen auf dem Gradienten auf. Cytdiagnostische Analysen der Fraktion, die die Tumorzellen enthielt, zeigte eine Anreicherung der Tumorzellen von 1 % auf 80-90 %. Die cytologischen Analysen der anderen Fraktionen zeigten, daß diese keine Tumorzellen mehr enthielten. Die Tumorzellfraktion aus dem Ficollgradienten wurde mit dem 10fachen Volumen an Kulturmedium zur Entfernung des Ficoll gewaschen und danach mit Hilfe einer Vitalfärbung (s. 2.2.6) auf lebende Zellen hin analysiert. Es zeigte sich, daß nahezu 100 % der nach dem Waschen resuspendierten Zellen vital waren. Nach dem Einstellen einer Zellzahl von 10^5 Zellen/ml konnten die Zellen, wie unter 2.3.4 beschrieben, weiter kultiviert werden. In Abb. 34 ist eine Anreicherung der Tumorzellen von einem Anteil von ca.

ANREICHERUNG VON TUMORZELLEN AUS MALIGNEN EXSUDATEN

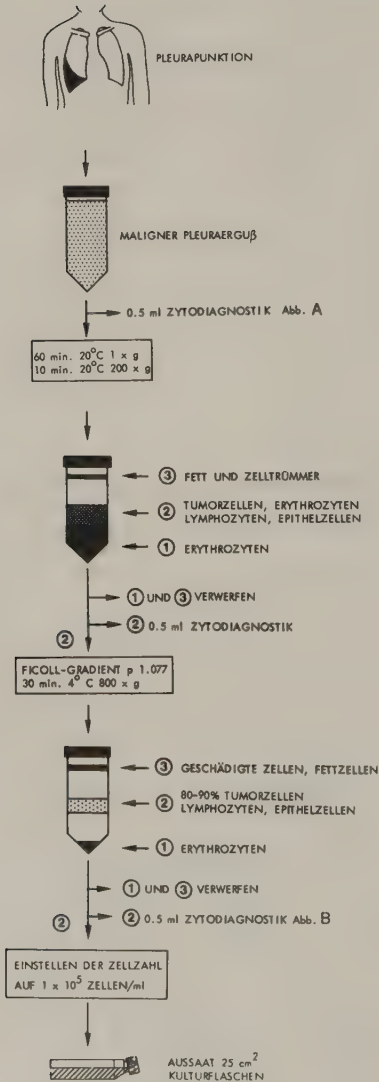


Abb. 30 Schema der Anreicherung von Tumorzellen aus malignen Ergüssen.

1-5 % auf einen Anteil von 80-90 % der Zellpopulation unter vollständiger Entfernung der Erythrocyten dargestellt (101, 102). Die in Abb. 31 B dargestellten Zellen fallen durch ihre geringe Größe und ihr zugunsten des Kerns verschobenes Kern/Plasmaverhältnis auf. Das schmale Cytoplasma erscheint im Cytozentrifugenpräparat stark vakuolisiert. Die Kerne haben ebenfalls ein gelockertes Aussehen mit zahlreichen euchromatinen Bezirken und viele fast farblos wirkende Nucleoli. Sie fallen durch ihre polymorphe Gestalt auf. Durch die genannten Charakteristika erfüllen die gezeigten Zellen die Kriterien eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Abb. 32 zeigt Kulturen von Tumorzellen kleinzelliger Lungenkarzinome, gewonnen aus Pleuraergüssen. Es wird demonstriert, daß kleinzellige Bronchialkarzinome sowohl adhärent wie auch in Suspension wachsen können. Die Häufigkeit der beiden Wuchsformen wird von unterschiedlichen Autoren von 100 % in Suspension wachsend (83) über 50 % in Suspension (103) bis zu 80 % angeheftet wachsend (*Korsgaard) angegeben. Abb. 33 zeigt die Zelllinien aus Abb. 32 nach Cytozentrifugation und Pappenheim-Färbung. Es wird deutlich, daß trotz des im Phasenkontrastmikroskop sehr unterschiedlichen Bildes die Zellen eine große Ähnlichkeit besitzen, daß also sowohl adhärent wie auch in Suspension wachsende Zellen die morphologischen Kriterien für ein kleinzelliges Bronchialkarzinom erfüllen können. Insgesamt konnten aus malignen Ergüssen 6 permanente Tumorzelllinien etabliert werden, bei denen es sich mit einer Ausnahme um kleinzellige Linien handelt.

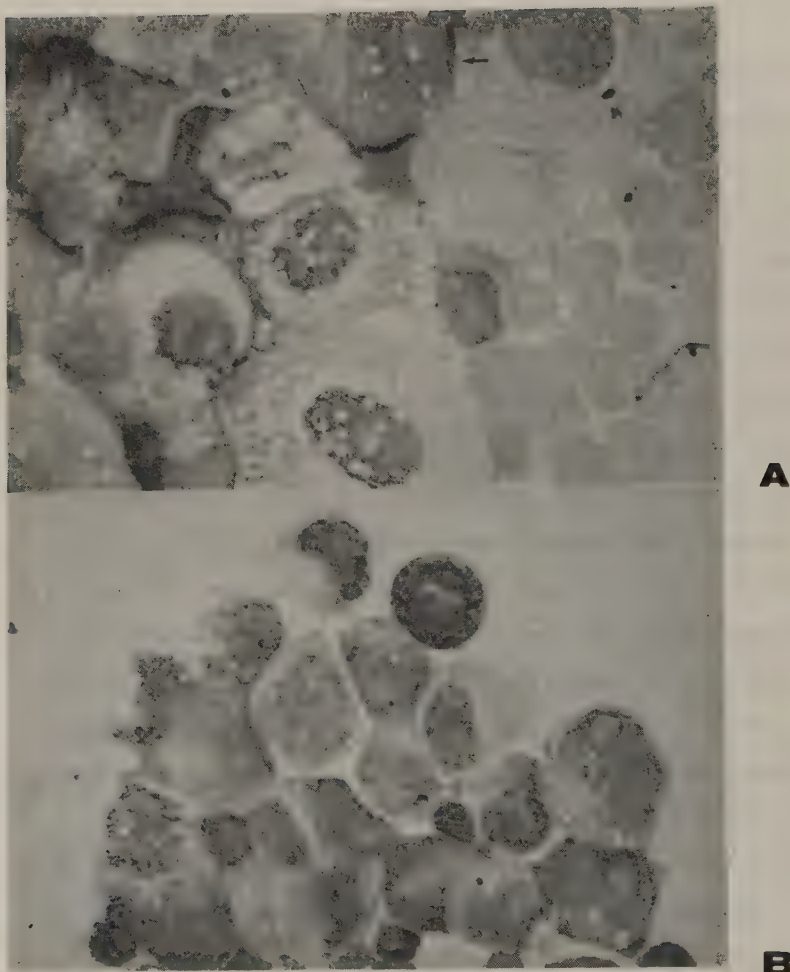
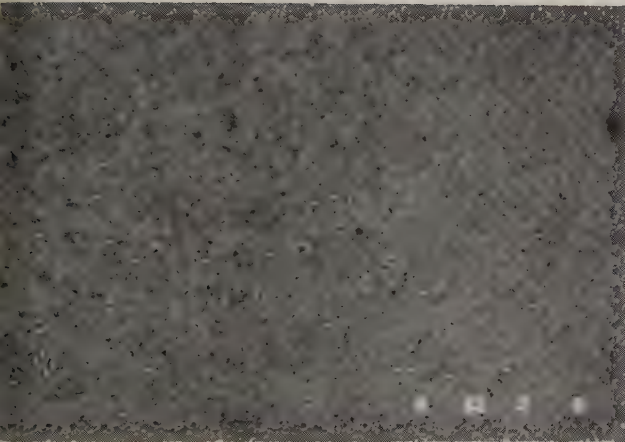


Abb. 31 Anreicherung von kleinzelligen Tumorzellen aus einem malignen Erguß (Cytozentrifugenpräparate nach Pappenheim-Färbung)

- A:** Das Präparat zeigt im abgebildeten Ausschnitt nur eine Zelle (←), bei der es sich wahrscheinlich um eine kleinzellige Lungentumorzelle handelt. Bei den übrigen abgebildeten Zellen handelt es sich um Erythrocyten, Blut- und Epithelzellen.
- B:** Die Abb. zeigt Zellen desselben Ergusses nach der Anreicherung der Tumorzellen in einem Ficollgradienten (s. 2.3.5). Die Zellen zeigen durch die relativ geringe Größe und ihren großen Kern mit dem relativ schmalen Cytoplasmasaum und dem Kernpolymorphismus die typischen Merkmale von kleinzelligen Lungentumorzellen (Vergrößerung 40 x).



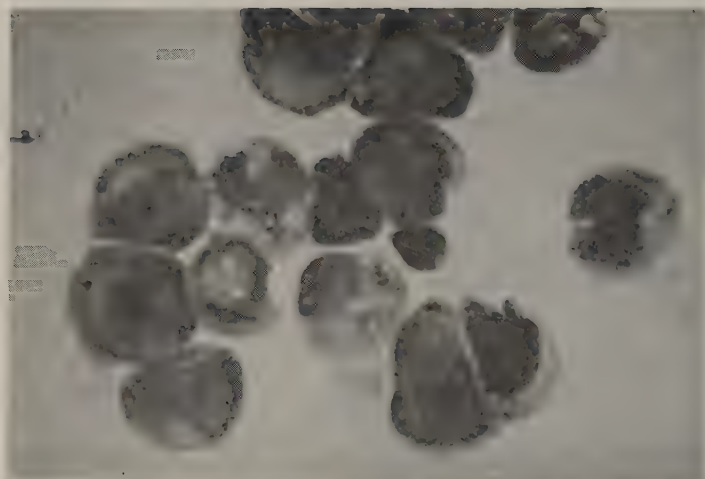
A



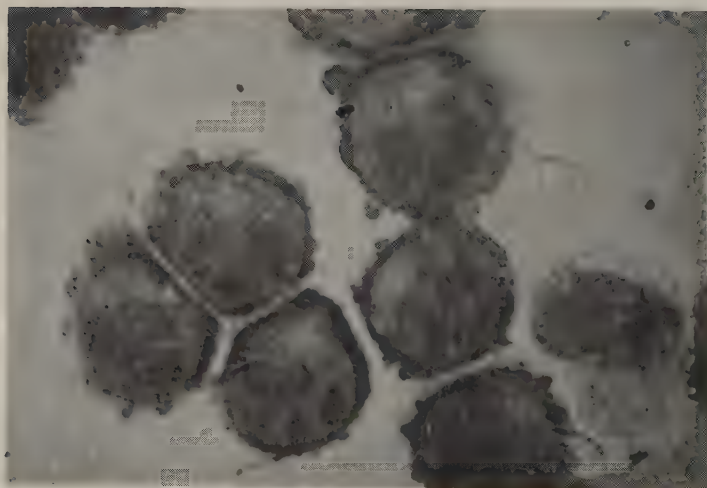
B

Abb. 32 Phasenkontrastaufnahmen von kleinzelligen Lungentumorzellkulturen.

- : Kleinzellige in Suspension wachsende Lungentumorzellkultur. Deutlich wird die kugelförmige Gestalt der in Suspension wachsenden Zellen wie die im Vergleich mit der Abb. 31 A geringe Größe der Zellen.
- : Adhärenz wachsende kleinzellige Lungentumorzelllinie kurz nach dem Erreichen der Konfluenz. Deutlich erkennbar sind die aneinander stoßenden, im Phasenkontrast aufleuchtenden Zellgrenzen. Darüber hinaus zeigt die Abb., daß adhärenz wachsende Zellen erheblich größer erscheinen als in Suspension wachsende Zellen. Der Größenvergleich mit der Abb. 32A verdeutlicht den Größenunterschied zwischen groß- u. kleinzelligen Lungentumorzellen (Vergrößerung 40 x).



A



B

Abb. 33 Cytozentrifugenpräparate nach Pappenheim-Färbung zweier kleinzelligen Lungentumorzellkulturen (s. 2.2.6).

A: Cytozentrifugenpräparat der in Abb. 35 A dargestellten in Suspension wachsenden kleinzelligen Lungentumorzellkultur.

B: Cytozentrifugenpräparat der in Abb. 36 B gezeigten adhärent wachsenden kleinzelligen Lungentumorzellkultur.

Beide Präparate zeigen den für kleinzellige Lungentumorzellen typischen, im Vergleich zur Zelle relativ großen Kern, mit dem schmalen, aufgelockerten Cytoplasmasaum und die im Vergleich zu Plattenepithel- und großzelligen Lungentumorzellen geringe Größe (Vergrößerung 400 x).

3.14.4 Etablierung von permanenten Tumorzelllinien aus Knochenmarkbiopsien

Bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom und dem Verdacht von Skelettmetastasen müssen zur diagnostischen Absicherung Knochenmarkbiopsien durchgeführt werden. Während es sich bei der Etablierung von Tumorzelllinien aus chirurgisch gewonnenem Material bzw. aus malignen Ergüssen um Tumorzelllinien handelt, die in der Regel vom Primärtumor abstammen, sind die aus dem Knochenmark von Lungentumorkranken gewonnenen Zellen stets Metastasenzellen.

Bei der Etablierung von Lungentumorzelllinien aus Knochenmarkaspiraten war es durch eine Ficolltrennung (s. 3.14.5) nicht möglich, eine homogene Kultur eines kleinzelligen Lungentumors zu etablieren, da auch geringe Mengen von epithelial wachsenden Knochenmarkzellen in den Kulturgefäßen anwuchsen und eine gute Proliferation zeigten. Adhärent wachsende Tumorzellen mußten durch Klonierung nach dem in Abbildung 30 dargestellten Schema gereinigt werden. Häufig wachsen jedoch die Tumorzellen in enger Assoziation mit den epithelialen Markzellen. In diesem Fall konnte durch zeitlich begrenzte Behandlung mit Trypsin, die unter mikroskopischer Kontrolle so lange durchgeführt wurde,

bis sich der überwiegende Teil der Tumorzellen von den Knochenmarkzellen gntrennt hatte, ohne daß sich letztere von den Kulturflaschen lösten, eine nahezu 100 % homogene Tumorzellkultur gewonnen werden. Es gelang in 5 Fällen aus diagnostisch gewonnenen Knochenmarkstanzen, permanente Tumorzelllinien zu etablieren.

3.15 Permanente Tumorzelllinien als Ausgangsmaterial für Untersuchungen zur Biosynthese von Peptidhormon-immunreaktiven Proteinen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es in 29 Fällen, aus chirurgisch entnommenem Material, aus Knochenmarkaspiraten oder malignen Ergüssen permanente Tumorzelllinien zu etablieren. Tab. 6 gibt einen Überblick über die histologische Verteilung und den Ursprung des Ausgangsmaterials, das Wachstumsverhalten sowie über die Art und Menge der von diesen Tumorzelllinien synthetisierten und in das Kulturmedium abgegebenen Peptidhormon-immunreaktiven Proteine. Es wird deutlich, daß die Fähigkeit zur Peptidhormonbiosynthese offenbar keine auf kleinzellige Lungentumoren beschränkte Fähigkeit sondern ein allgemeineres Charakteristikum der Bronchialkarzinome ist. Außerdem zeigt

	MR-1	MR-2	MR-3	MR-4	MR-5	MR-6	MR-7	MR-8
HISTOLOGIE	ADENO- LUNGEN- TUMOR	GROßZELL- LUNGEN- TUMOR	ADENO- LUNGEN- TUMOR	ADENO- LUNGEN- TUMOR	ADENO- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	GROßZELL- LUNGEN- TUMOR	GROßZELL- LUNGEN- TUMOR
HERKUNFT	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR 1. PASSAGE N. RATTE	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR
ACTH	-	+	-	-	++	-	++	++
β-LIPOTROPIN	-	-	-	-	+	-	+	+
CALCITONIN	-	+	-	-	-	-	+	+
WACHSTUM: ++ SEHR GUT + GUT 0 STAGNIERT - KEIN WACHSTUM	-	0	0	+	-	+	+	+
SERUM-ACTH	-	+	-	-	+	-	-	-
SERUM-CALCITONIN	-	-	-	-	-	-	+	-

	MR-9	MR-11	MR-12	MR-13	MR-15	MR-16	MR-17	MR-18
HISTOLOGIE	VERHORN. PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	NICHT- VERHORN. PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	GROßZELL- PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	GROßZELL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	VERHORN. PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR
HERKUNFT	PRIMÄR- TUMOR	PLEURA- PUNKTAT	BECKEN- KAMM- BIOPSIE	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR	BECKEN- KAMM- BIOPSIE	BECKEN- KAMM- BIOPSIE	PRIMÄR- TUMOR
ACTH	++	-	-	+	-	-	-	+
β-LIPOTROPIN	+	-	-	-	-	-	-	-
CALCITONIN	-	-	-	++	-	-	-	+
WACHSTUM: ++ SEHR GUT + GUT 0 STAGNIERT - KEIN WACHSTUM	0	+	-	+	+	-	-	+
SERUM-ACTH	-	-	-	-	-	-	-	-
SERUM-CALCITONIN	-	-	-	++	-	-	+	-

Tab. 6

	MR-19	MR-20	MR-21	MR-22	MR-23	MR-24	MR-25	MR-26
HISTOLOGIE	MÄßIG DIFF. PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	UNDIFF. EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	VER- SCHLEIM, PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR
HERKUNFT	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR	PLEURA- PUNKTAT	PERICARD- ERGÜß	PLEURA- PUNKTAT	PLEURA- PUNKTAT	PRIMÄR- TUMOR	BECKEN- KAMM- BIOPSIE
ACTH	+	+	-	-	-	-	+	+
β-LIPOTROPIN	-	-	-	-	-	-	-	-
CALCITONIN	-	-	-	+	+	-	+	-
WACHSTUM: ++ SEHR GUT + GUT 0 STAGNIERT - KEIN WACHSTUM	+	+	+	+	-	0	+	+
SERUM-ACTH	+	+	-	-	+	-	-	-
SERUM-CALCITONIN	-	-	+	++	-	-	-	-

	MR-27	MR-28	MR-31	MR-32	MR-33			
HISTOLOGIE	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	KLEINZELL- LUNGEN- TUMOR	MÄßIG DIFF. PLATTEN- EPITHEL- LUNGEN- TUMOR	MÄßIG DIFF. VER- HORNEND, PLATTEN- EPITHEL- LU-TUMOR	WENIG DIFF. VER- HORNEND, PLATTEN- EPITHEL- LU-TUMOR			
HERKUNFT	PLEURA- PUNKTAT	BECKEN- KAMM- BIOPSIE	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR	PRIMÄR- TUMOR			
ACTH	-	+	+	+	+			
β-LIPOTROPIN	-	-	-	-	-			
CALCITONIN	-	+	-	+	+			
WACHSTUM: ++ SEHR GUT + GUT 0 STAGNIERT - KEIN WACHSTUM	+	+	0	++	+			
SERUM-ACTH	-	-	-	-	-			
SERUM-CALCITONIN	-	+	-	+	+			

sich eine gute Korrelation zwischen den im Serum, bzw. Pleura- oder Pericarderguß der entsprechenden Patienten nachgewiesenen Peptidhormon-immunreaktiven Proteinen und den Syntheseleistungen der Tumoren dieser Patienten in der Zellkultur.

Tumorzelllinien, die größere Mengen an ACTH-immunreaktiven Proteinen in die Kulturmedien abgaben, wurden auch auf das Vorhandensein von β -Lipotropin und β -Endorphin immunreaktiven Proteinen untersucht. Aus den Versuchen zur Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe von Gelfiltrationen aus dem Serum von Lungentumorpatienten sowie aus Tumorextrakten (s. 3.1 u. 3.3) war bekannt, daß es sich bei den von Lungentumoren produzierten ACTH-immunreaktiven Proteinen um hochmolekulare Proteine handelt. Nach den heute allgemein anerkannten Vorstellungen (56, 57, 58), entsteht das ACTH zusammen mit dem β -Lipotropin durch ein Processing aus einem gemeinsamen Vorläufermolekül. Falls es sich bei den vom Tumor synthetisierten Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen um Prohormone handeln sollte, müßte parallel β -Lipotropin-immunreaktives Protein erwartet werden. Tab. 4 zeigt, daß die Tumoren, die hohe Raten an ACTH-immunreaktiven Proteinen synthetisieren, ebenfalls relativ große Mengen an β -Lipotropin-immunreaktivem Protein ins Kulturmedium abgeben. Eine Untersuchung bezüglich der β -Lipotropin-Sekretion der Tumoren mit geringerer ACTH-Produktion war nicht möglich, da die vorhandenen Nachweismethoden zu unempfindlich waren, um so geringe β -Lipotropin-Mengen, wie sie aufgrund der ACTH-Produktion dieser Zelllinien zu er-

warten gewesen wären, zu bestimmen, zumal die in den radioimmunologischen Tests eingesetzten Antikörper gegen β -Lipotropin und gegen ACTH unterschiedliche Affinitätskonstanten zu ihren Antigenen aufwiesen. Betrachtet man die Calcitonin- und ACTH-immunreaktiven Proteine in den Zellkulturmedien vergleichend mit den Calcitonin- und ACTH-Konzentrationen im Serum der Patienten, deren Tumoren das Ausgangsmaterial für die Zellen lieferten, fällt auf, daß keine Zelllinie kleinzelligen Ursprungs Calcitonin-Konzentrationen über 500 pg/ml ins Kulturmedium sezernierte, daß aber andererseits ACTH-Konzentrationen über 1000 pg/ml im Kulturmedium gemessen wurden. Calcitonin- und ACTH-Konzentrationen im Patientenserum lagen also in einem Mengenverhältnis von ca. 10:1 (s. Abb. 1) vor, während sich in den Kulturmedien nahezu umgekehrte Größenordnungen (1:2, s.o.) zeigen ließen.

Die relativ niedrigen Calcitonin-Biosyntheseraten könnten auf den Ursprung der Calcitonin sezernierenden, kleinzelligen Linien aus malignen Ergüssen zurückzuführen sein. Maligne Ergüsse treten in der Regel erst während der Therapie auf. Die aus Ergüssen gewonnenen Zellen sind wahrscheinlich größtenteils durch die Chemotherapie vorgeschädigt. Durch Weichagar-klonierung wurde versucht (Abb. 34), die am besten proliferierenden Zellen abzutrennen und so möglicherweise Zelllinien mit einer höheren Calcitonin-Biosyntheserate zu gewinnen. Es

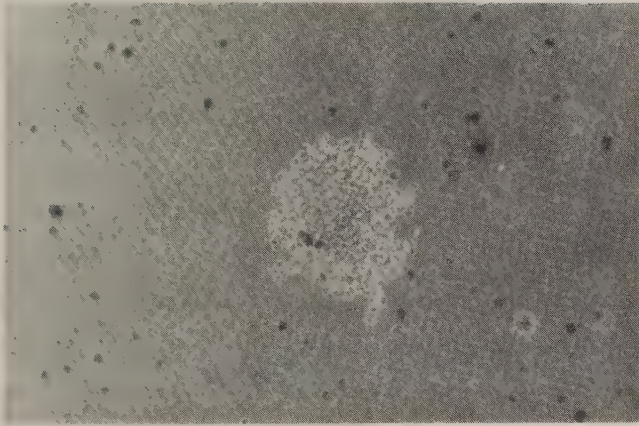


Abb. 34 Etablierung einer monoclonalen kleinzelligen Lungentumorzellkultur durch Weichagarkultivierung.

In eine Petrischale mit einem Boden, der aus einer hydrophilen gasdurchlässigen Membran bestand, wurde eine 2-3 mm dicke 0,5 %ige Agar-Schicht in MEM-Dulbecco's Kulturmedium mit 16,6 % fötalem Kälberserum ausgegossen. Nach dem Erstarren wurde diese Schicht mit 2-3 mm 0,3 %igem Agar im gleichen Medium überschichtet. Nach dem Abkühlen dieser Schicht auf 37 °C vor dem Festwerden des Agars wurde 1 ml einer 10^5 Zellen enthaltenden kleinzelligen Lungentumorzellsuspension unter die Weichagarschicht gemischt. Die Abb. zeigt einen 8 Wochen alten, aus einer Zelle entstandenen kleinzelligen Lungentumorzellklon (Vergrößerung 40 x).

gelang auf diese Weise, aus einzelnen Zellen gut proliferierende Klone zu etablieren, die 500 pg/ml Calcitonin-immunreaktives Protein ins Kulturmedium sezernierten.

Es sollte nun versucht werden, anhand einiger ausgewählter Tumorzelllinien mit hoher Syntheseleistung, die von diesen Tumorzelllinien produzierten Peptidhormon-immunreaktiven Proteine näher zu untersuchen und zu den aus Serum und Gewebe dieser Patienten erarbeiteten Befunde in Beziehung zu setzen. Von den in Tab. 6 aufgeführten Zelllinien wurden MR-7, MR-8, MR-13 und MR-22 für derartige Untersuchungen ausgewählt. Zusätzlich wurden von Korsgaard (Lund, Schweden) und Sorenson (Hanover, New Hampshire, USA) überlassene Lungentumorzelllinien in die Untersuchungen einbezogen. Um weitgehend auszuschließen, daß es sich bei den betrachteten Phänomenen um Kulturartefakte handelt, wurden morphologische Langzeituntersuchungen durchgeführt: Abb. 32 A zeigt ein Beispiel einer in Suspension wachsenden kleinzelligen Lungentumorlinie phasenkontrastmikroskopisch in Kultur. Abb. 33 A zeigt dieselbe Kultur nach 15 Passagen im Cytozentrifugenpräparat. Beim Vergleich mit der Abb. 33 B, die kleinzellige Lungentumorzellen direkt nach einer Ficoll-Trennung zeigt, wird deutlich, daß auch nach 15 Passagen keine morphologischen Veränderungen eingetreten sind und die Zelllinie die Charakteristika eines kleinzelligen Lungentumors weiterhin erfüllt.

3.16. Calcitonin- und Adrenocorticotropin-Produktion durch Tumorzelllinien während des Wachstums

Um zu analysieren, ob Tumorzellen die Peptidhormon-immunreaktiven Proteine während ihrer Proliferation ständig sekretieren oder nur in bestimmten Wachstumsphasen, wurden Tumorzellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro ml in Mikrotiterplatten ausgesät, und die Peptidhormonproduktion zu verschiedenen Zeitpunkten während der Wachstumskurve analysiert.

Abb. 35 zeigt beispielhaft die Produktion von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen durch eine Plattenepithelkarzinomlinie während ihres Wachstums. Diese Zellen sezernieren Calcitonin-immunreaktives Protein von Beginn ihres Wachstums an, die Syntheseleistung pro Zelle nimmt nach Erreichen einer bestimmten Dichte der Tumorzellen jedoch wieder ab. Bis zum Absterben der Zellen bleibt eine annähernd gleiche Konzentration dieser Peptidhormon-immunreaktiven Substanzen im Kulturmedium erhalten.

In Abb. 36 ist die Sekretionsrate von Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen während des Wachstums am Beispiel einer großzelligen Lungentumorzelllinie dargestellt. Es zeigt sich, daß die Synthese von Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen erst bei einer sehr viel höheren Zellkonzentration ihr Maximum pro Zelle erreicht, daß die Konzentration pro ml Kulturmedium über einen längeren Zeitraum hinweg ansteigend ist und bis zum Absterben der ersten Zellen kein Plateau erreicht.

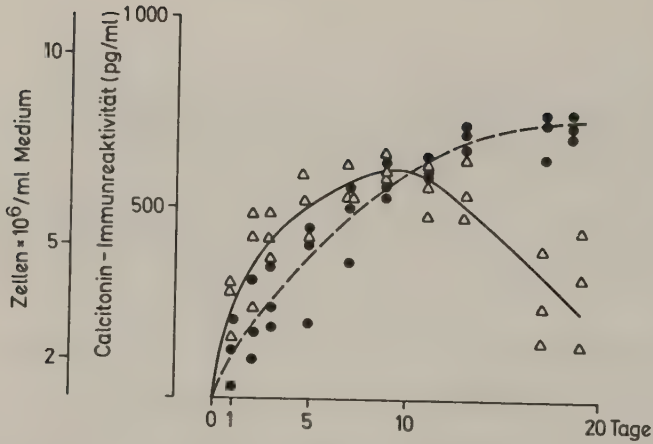


Abb. 35 Abgabe von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen ins Kulturmedium durch Lungentumorzellen in permanenter Zellkultur während der Proliferation.

Plattenepithellungentumorzellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 in Mikrottestplatten mit 2 ml Rauminhalt ausgesät. Im Abstand von 24 Std. wurde das Kulturmedium über 20 Tage entnommen und die Zellzahl (●-●) durch Auszählen in der Zählkammer ermittelt. Der Gehalt an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen im Kulturmedium (Δ-Δ) wurde radioimmunologisch bestimmt (s. 2.2.1).

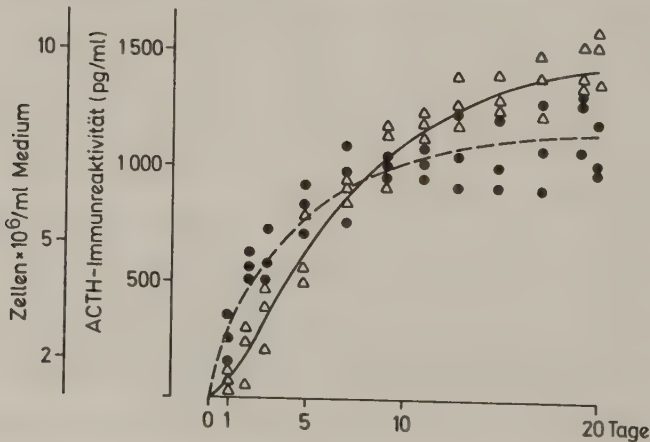


Abb. 36 Abgabe von ACTH-immunreaktiven Proteinen ins Kulturmedium durch Lungentumorzellen in permanenter Zellkultur während der Proliferation.

Großzellige Lungentumorzellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 in Mikrottestplatten mit 2 ml Volumen ausgesät. Im Abstand von 24 Std. wurde das Medium über 20 Tage entnommen und die Zellzahl (●-●) durch Auszählen in der Zählkammer ermittelt. Der Gehalt an ACTH-immunreaktivem Protein im Kulturmedium (Δ Δ) wurde radioimmunologisch bestimmt (s. 2.2.6).

Die beiden Peptidhormon-immunreaktiven Proteine werden also zumindest unterschiedlich von den Tumorzellen ins Medium sezerniert. Über die Biosynthese der Hormone kann anhand dieser Daten jedoch noch keine Aussage getroffen werden.

3.16.1 Gelfiltration von durch Tumorzelllinien synthetisierten Calcitonin- und Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen

Die Auftrennung durch Gelfiltration an AcA 54 von Kulturmedien von Tumorzelllinien bereitete keine Schwierigkeiten, da es ohne weiteres möglich war, die Kulturmedien durch Gefriertrocknung auf Konzentrationen von 100 mg Protein/ml anzureichern. Die so konzentrierten Kulturmedien enthielten bis zu 17.000 pg/ml Adrenocorticotropin- und bis zu 7.000 pg/ml Calcitonin-immunreaktives Protein. Abb. 37 zeigt die Auftrennung von Calcitonin-immunreaktivem Protein aus dem Kulturmedium einer Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Beim Plattenepithelkarzinom fällt ein hoher Anteil der Proteinfraction mit einem Molekulargewicht um 100.000 Dalton auf neben einem relativ viel geringeren Anteil von Calcitonin-immunreaktivem Protein mit einem Molekulargewicht von 48.000 Dalton. Dagegen werden im Kulturmedium von Zelllinien kleinzelliger Bronchialtumoren drei Calcitonin-immunreaktive Proteine gefunden, die

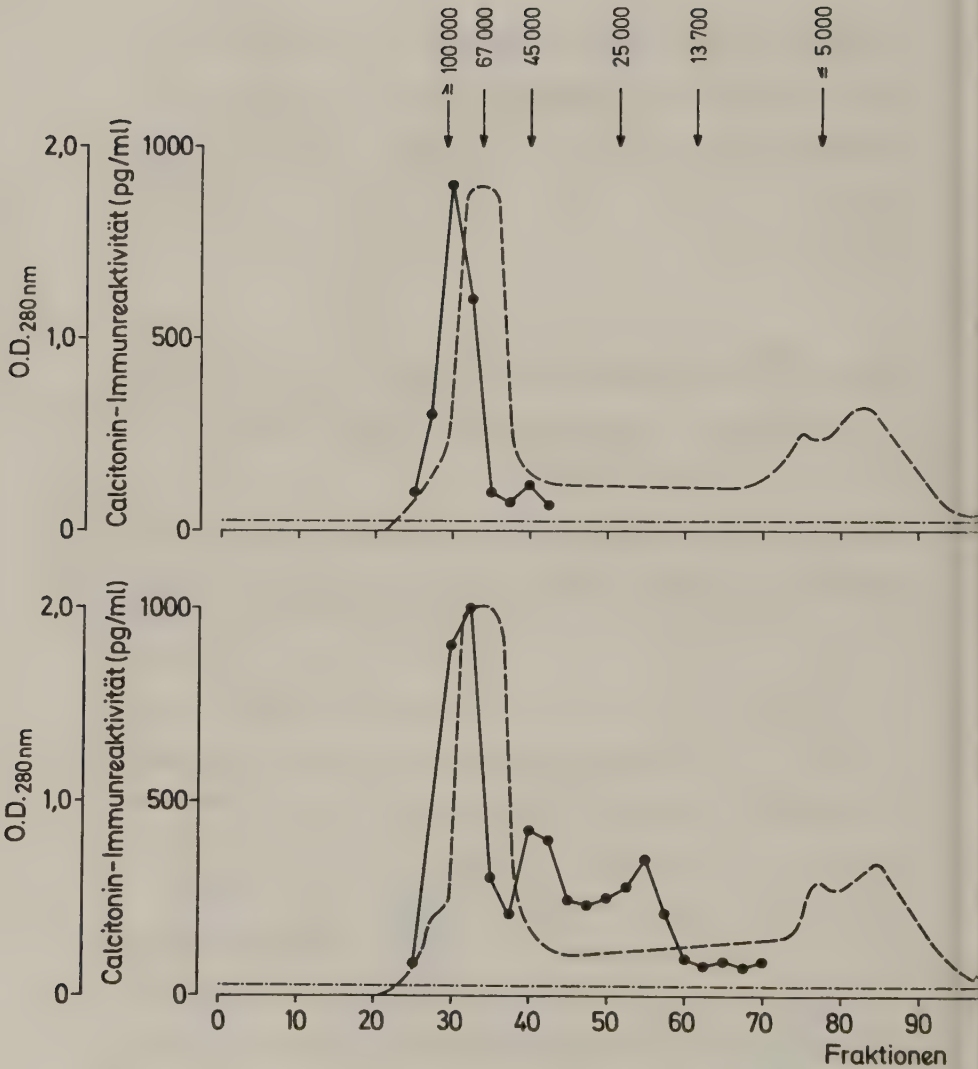


Abb. 37 Calcitonin-immunreaktive Proteine nach Auftrennung des Kulturmediums zweier Lungentumorzellkulturen durch Gelfiltration an AcA 54.

Kulturmedien von kleinzelligen und Plattenepithel-Lungentumorzellkulturen wurden nach 6 Tagen Kulturdauer dialysiert

(s.2.3.2) und durch Gefriertrocknung konzentriert. Die in H_2O resuspendierten Medien wurden auf eine AcA 54-Säule (2,5x 85 cm) aufgetragen und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h (s.3.1.1) filtriert. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (----) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Die Fraktionen wurden nach erneuter Konzentration durch Gefriertrocknung auf ihren Gehalt an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen (●—●) radioimmunologisch analysiert (s. 2.2.1). Der 10fach konzentrierte Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markiertem Antigen, die einer Calcitoninkonzentration von 25 pg/ml (---) $\pm$ 15 pg/ml entsprach.

die gleiche molekulare Verteilung zeigen, wie die auch schon aus Tumorgewebe und Serum von Patienten mit kleinzelligen Lungentumoren isolierten Proteine (Abb. 38). Trotz dieser guten Übereinstimmung der Zellkulturdaten mit den Ergebnissen, die aus Lungentumorgewebe und Serum von kleinzelligen Lungentumorpatienten gewonnen wurden, muß berücksichtigt werden, daß - mit Ausnahme der Untersuchungen im Serum - nur eine sehr begrenzte Anzahl von Fällen charakterisiert werden konnte, so daß diese Ergebnisse nicht für alle kleinzelligen Bronchialkarzinome repräsentativ sein müssen. Eine Gelfiltration von Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen an AcA 54 aus Kulturmedien von einer großzelligen und einer kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinie zeigt Abb. 38. Im Kulturmedium des großzelligen Lungentumors stellt ACTH-immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 100.000 Dalton den Hauptanteil. Daneben treten weitere Proteine mit Molekulargewichten von ca. 30.000 und 20.000 Dalton auf. Im Kulturmedium der kleinzelligen Lungentumorlinie ist die Proteinfraction mit dem Molekulargewicht von $\approx$ 100.000 Dalton ebenfalls vorhanden, jedoch in deutlich geringerer Menge. Hier überwiegen die

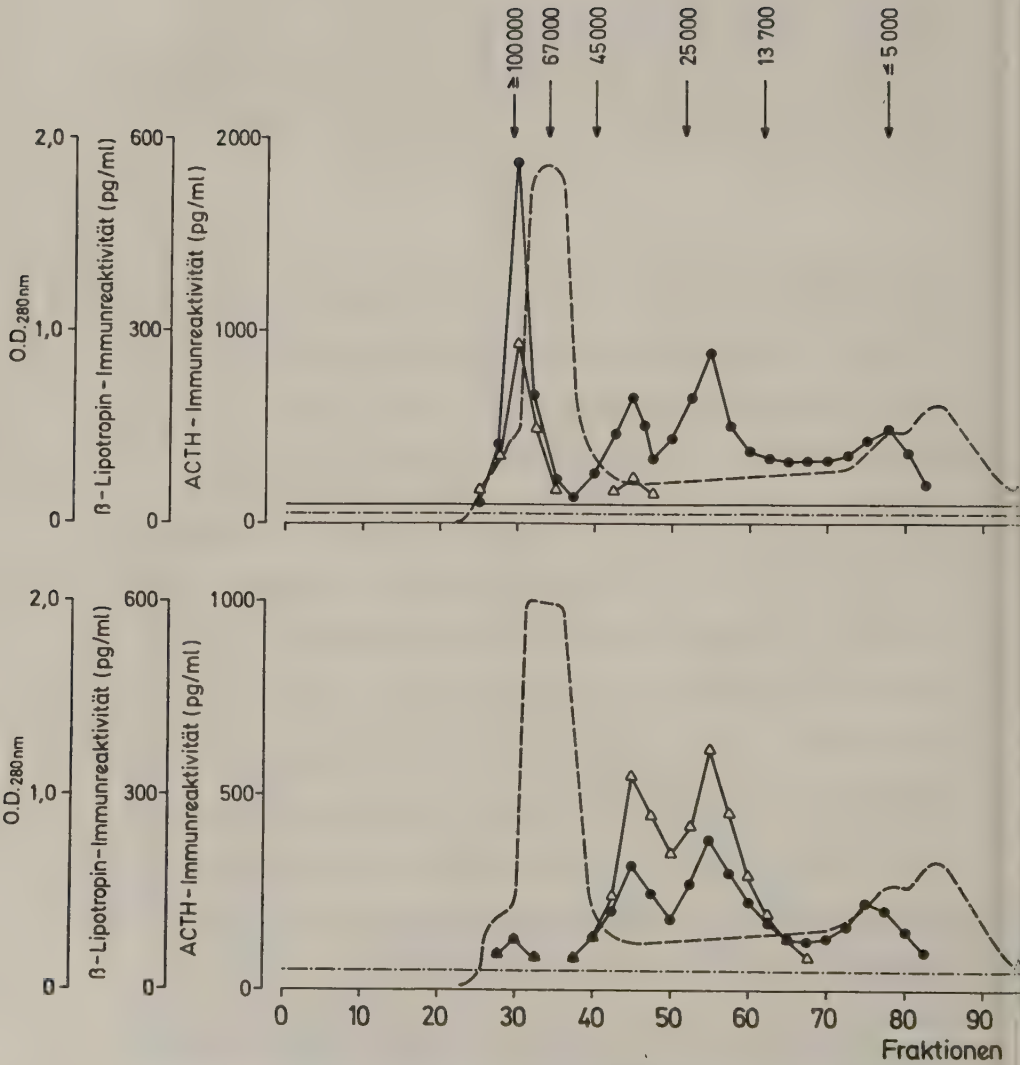


Abb. 38 ACTH- und β -Lipotropin-immunreaktive Proteine aus Kulturmedien zweier Lungentumorzelllinien nach Gel-filtration an Aca 54.

Die Kulturmedien einer klein- und einer großzelligen Lungentumorzelllinie wurden nach 8 Tagen Kulturdauer dialysiert (s. 2.3.2) und durch Gefriertrocknung konzentriert. Die in H₂O resuspendierten Tumorzellkulturmedien wurden auf eine ACA 54-Säule (2,5 x 85 cm) aufgetragen und mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 16 ml/h (3.1.1) filtriert. Die Absorption des Proteins bei 280 nm (---) wurde in einer Durchflußküvette gemessen. Der Elutionspuffer ergab im immunologischen Test eine Verdrängung von radioaktiv markierte Antigen, die einer ACTH-Konzentration von 50 pg/ml $\pm$ 20 pg/ml (oben:---) und einer β -Lipotropin-Konzentration von 30 pg/ml $\pm$ 15 pg/ml (---), (unten:---) entsprach. Die Fraktionen wurden radioimmunologisch auf ihren Gehalt an ACTH- (●●) und β -Lipotropin-immunreaktivem Protein (Δ — Δ) analysiert (s. 2.2.1).

oben - Gelfiltration eines Kulturmediums einer großzelligen Lungentumorzellkultur

unten - Gelfiltration eines Kulturmediums einer kleinzelligen Lungentumorzellkultur

beiden ACTH-immunreaktiven Proteine mit den Molekulargewichten von 30.000 und 20.000 Dalton. Zusätzlich war in allen Kulturmedien ACTH-immunreaktives Protein mit dem Molekulargewicht von physiologischem ACTH nachweisbar. Es bestand die Hypothese, daß es sich bei den im Medium von Tumorzellkulturen nachgewiesenen hochmolekularen ACTH-immunreaktiven Proteinen um ACTH- β -Lipotropin-Vorläufermoleküle (s. Abb. 2) handelt. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Säulenfraktionen im Radioimmunoassay zusätzlich noch auf β -Lipotropin-immunreaktives Protein analysiert. Im Kulturmedium der großzelligen Lungentumorlinie zeigte sich ein zum ACTH paralleler Verlauf des β -Lipotropins im Bereich der Molekulargewichte von 100.000 und 30.000 Dalton, während im Bereich der niedrigen Molekulargewichte keinerlei β -Lipotropin-immunreaktives Protein nachweisbar war. Im Kulturmedium der kleinzelligen Lungentumorzelllinie wurde eine Parallelität zwischen β -Lipotropin- und ACTH-immunreaktiven Proteinfraktionen bis 20.000 Dalton gemessen.

3.16.2 SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese von
Calcitonin-immunreaktivem Protein aus Lungentumor-
zellen

Durch Gelfiltration an AcA 54 aus Kulturmedium von Tumorzellinien gewonnene Calcitonin-immunreaktive Proteinfractionen mit Molekulargewichten von 100.000, 48.000 und 20.000 Dalton wurden, wie auch schon die äquivalenten Fraktionen aus dem Serum und Tumorgewebe von Lungentumorkranken (s. Abb. 10) nach Denaturierung in Gegenwart von SDS in 12 bis 16 %igen Polyacrylamid-Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt. Zu diesem Zweck war es notwendig, die bei der Gelfiltration gewonnenen Proteinfractionen durch Gefriertrocknen um mindestens einen Faktor 20 zu konzentrieren. Durch die SDS-Inkubation wurde die Fraktion mit einem Molekulargewicht von 100.000 zu zwei Proteinen mit Molekulargewichten von 17.000 und 3.500 Dalton gespalten (Abb. 39). Die im Kulturmedium von kleinzelligen Lungentumorzellinien auftretende 20.000 Dalton Fraktion wurde durch SDS, ebenso wie im Serum und im Tumorgewebeextrakt, lediglich zu einem Molekulargewicht von ca. 17.000 Dalton dissoziiert.

Abb. 39

- oben - 100.000 Dalton-Fraktion aus dem Kulturmedium einer Plattenepitheltumorzelllinie nach Auftrennung an AcA 54 (Abb. 37)
- Mitte - 100.000 Dalton-Fraktion aus dem Kulturmedium einer kleinzelligen Tumorzelllinie nach Auftrennung an AcA 54 (Abb. 37)
- unten - 20.000 Dalton-Fraktion aus dem Kulturmedium einer kleinzelligen Lungentumorzelllinie nach Auftrennung an AcA 54 (Abb. 37)

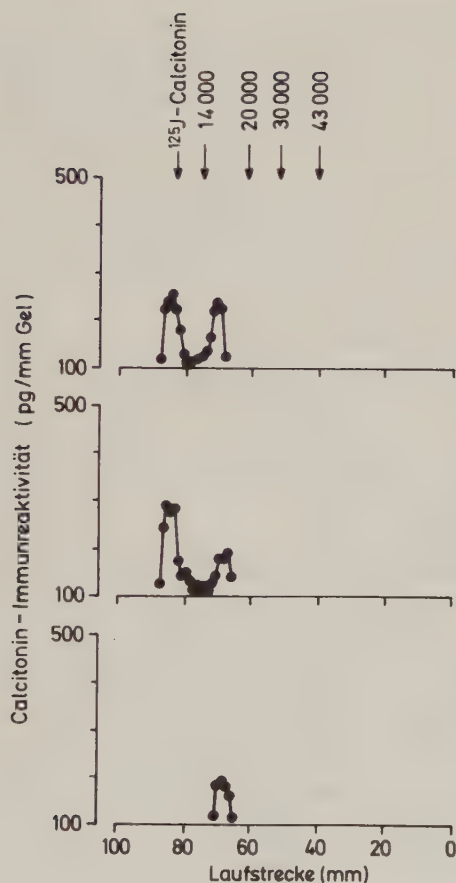


Abb. 39 SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese der durch Gelfiltration gewonnenen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfraktionen aus Zellkulturmedien.

Nach der Gelfiltration durch Gefriertrocknung konzentrierte Calcitonin-immunreaktive Proteinfraktionen wurden nach 30 Min. Inkubation bei 56 °C mit SDS und DTE elektrophoretisch aufgetrennt. Unmittelbar nach Abschluß der Trennung wurde das Gel in seine einzelnen Laufkanäle zerteilt und die Markerproteine enthaltenden Kanäle mit Servablau 250 R gefärbt. Das übrige Gel wurde 6 Std. in 0,9 %iger NaCl-Lösung gewässert. Nach dem Zerteilen der einzelnen Laufkanäle in 2,5 mm breite Abschnitte wurden diese mit 0,1 M Boratpuffer für 24 Std. unter Schütteln bei 4 °C eluiert (2.3.1.8). Die Eluate dieser Fraktionen wurden radioimmunologisch auf ihren Gehalt an Calcitonin-immunreaktivem Protein analysiert (s. 2.2.1).

4. DISKUSSION

Die Diskrepanz zwischen der Häufigkeit von paraneoplastischen Syndromen und erhöhten Hormonspiegeln bei Lungentumorpationen hatte auf das Vorhandensein von hormonimmunreaktiven Proteinen, die sich molekular von den physiologischen Hormonen unterscheiden, hingewiesen. Dieser Befund führte zu der Hoffnung, daß eine spezifische Bestimmung der Peptidhormon-immunreaktiven Proteine

1. einen früheren Hinweis auf einen Lungentumor erbringen würde, da auch sehr geringe Mengen vom Tumor synthetisierter Peptidhormone sich vom physiologischen Hormon unterscheiden ließen.
2. Auf der gleichen Grundlage könnte ein größerer Prozentsatz der Lungentumorpationen erfaßt und einer spezifischen Therapiekontrolle zugeführt werden.
3. Durch die bereits erwähnte Differentialdiagnose des kleinzelligen Bronchialkarzinoms könnten gerade diese Patienten mit der schlechten Prognose schneller zu einer gezielten Therapie geführt werden.

4.1. Charakterisierung von Calcitonin-immunreaktivem Protein in Serum und Gewebe von Lungentumorpationen

Die Biosynthese von Calcitonin durch Tumoren wurde erstmals von Riniker et al. (68) für das C-Zellkarzinom der Schilddrüse beschrieben. Bei diesem Tumor ist die immunologische Bestimmung von Calcitonin mittlerweile zu einem wichtigen

Parameter für Diagnostik und Therapiekontrolle geworden (104). Verschiedene Autoren (54, 105) beschrieben einige Jahre später pathologisch erhöhte Calcitoninkonzentrationen im Serum von Patienten mit Lungentumoren, wobei die höchsten Calcitoninkonzentrationen im Serum der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom gefunden wurden (106). Da Patienten mit hohen Calcitoninkonzentrationen im Serum normale Calciumspiegel aufwiesen, wurde vermutet, daß das im Verlauf der Tumorerkrankung zirkulierende Calcitonin physiologisch inaktiv ist. Molekulargewichtsbestimmungen des Calcitonins aus dem Serum von Lungentumorpatienten resultierten dann auch in drei Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen mit Molekulargewichten von 100.000, 48.000 und 20.000 Dalton, ohne daß Calcitonin mit dem Molekulargewicht von physiologischem Calcitonin nachweisbar gewesen wäre.

Serienmäßige Bestimmungen der Calcitonin-immunreaktiven Proteine im Serum von Patienten mit Lungentumoren während der Therapie zeigten, daß zwischen der Stoffwechselaktivität des Tumors und allen drei Calcitonin-immunreaktiven Proteinen im Serum eine enge Korrelation besteht (Abb. 5). Diese Serienuntersuchungen konnten bereits als guter Hinweis auf eine Calcitonin Biosynthese durch die Tumorzellen gewertet werden.

In der Literatur wird jedoch immer noch diskutiert, daß die im Serum von Tumorpatienten zirkulierenden Peptidhormon-immunreaktiven Substanzen nicht von den Tumoren selbst gebildet werden, sondern reaktiv auf den Tumor am physio-

logischen Syntheseort (107). Immunfluoreszenzoptische Untersuchungen zeigten jedoch intra- und extrazellulär Calcitonin-Immunreaktivität im Tumorgewebe, während umgebendes, nicht vom Tumor infiltriertes Lungengewebe völlig negativ reagierte (Abb. 7).

Der Versuch einer Isolierung von hochmolekularem Calcitonin aus Tumorgewebe erschien demnach erfolgversprechend. Die Analyse des Molekulargewichtes Calcitonin-immunreaktiver Proteine aus dem Tumorgewebe sollte Hinweise auf einen möglichen Abbau der Proteine während ihrer Ausschleusung ins Serum erbringen. Aus frischem, bei Autopsien gewonnenem Tumorgewebe konnten die gleichen drei Calcitonin-immunreaktiven Proteinfraktionen, wie aus dem Serum voneinander getrennt werden. Allerdings zeigten diese Gelfiltrationen eine Verschiebung zugunsten der höhermolekularen Fraktionen. Es schien also tatsächlich ein hochmolekulares Calcitonin-immunreaktives Protein in der Zelle gebildet zu werden, das offensichtlich sogar über einen bestimmten Zeitraum dort gespeichert wird, bevor es möglicherweise unter Aufspaltung ausgeschleußt wird (108). Da Aggregationen zwischen physiologischem Calcitonin und anderen physiologischen Proteinen bereits zu Beginn durch Inkubationen von radioaktiv markiertem Calcitonin mit Serum von Tumorkranken weitgehend ausgeschlossen werden konnten (s. Abb. 6), sollte versucht werden, solche Spaltprodukte zu charakterisieren. Mit Hilfe einer Gewebsaufarbeitung konnten alle Charakteri-

sierungsversuche standardisiert werden, sodaß sie danach auf aus dem Serum isolierte Proteinfractionen übertragen werden konnten. Mit diesen Methoden war es dann möglich, mehrere Seren verschiedener Patienten zu untersuchen. So konnte sichergestellt werden, daß die gefundenen Daten nicht individualspezifisch sondern repräsentativ zumindestens für kleinzellige Lungentumoren sind.

Bei den Inkubationen der beiden Calcitonin-immunreaktiven Proteinfractionen mit den höchsten Molekulargewichten entstanden übereinstimmend aus Gewebe und aus Serum in Gegenwart von SDS Calcitonin-immunreaktive Proteinfractionen mit Molekulargewichten von 17.000 und 3.500 Dalton.

Diese Befunde geben Anlaß zu der Annahme, daß die beiden hochmolekularen Calcitonin-immunreaktiven Proteine ein 17.000 Dalton Protein enthalten, welches relativ stabil ist. Die Vermutung, daß das Molekül mit dem Molekulargewicht von 3.500 Dalton durch weitere Spaltung aus dem 17.000 Dalton Calcitonin-immunreaktiven Protein entsteht, ist unwahrscheinlich, da das 17.000 Dalton Protein auch längerdauernde Inkubationen mit SDS gut übersteht. Es muß daher angenommen werden, daß beide Proteine in den hochmolekularen Fraktionen enthalten sind. Die proteolytischen Abbauxperimente mit Trypsin und Pepsin unterstützen die Vorstellung, daß es sich bei dem 17.000 Dalton Calcitonin-immunreaktiven Protein um ein stabiles Coreprotein handelt.

Diese Ergebnisse werden durch die Daten von Jacobs et al. (109) und Desplan et al. (110) bekräftigt, die in einem hetero-

logen, zellfreien medullären Schilddrüsen mRNA System Calcitonin-immunreaktive Translationsprodukte mit Molekulargewichten von 15. bis 17.000 Dalton beschreiben konnten. Darüberhinaus isolierten sie eine Calcitonin-immunreaktive Proteinfraktion mit dem Molekulargewicht von 55.000 Dalton aus medullärem Schilddrüsenkarzinomgewebe. Desplan et al.(110) spekulieren, daß es sich dabei möglicherweise um ein Produkt der posttranslationalen Modifikationen des Vorläufers in einer Speicherform handelt. Diese Speicherhypothese läßt sich gut vereinbaren mit den Molekulargewichten der aus Tumorgewebe aufgetrennten Calcitonin-immunreaktiven Proteine. Die höhermolekularen Proteine scheinen nicht sofort aus der Tumorzelle ausgeschleußt zu werden (vergl. Abb.3 mit Abb.8).

Roos et al. (111) beschrieben für Calcitonin-immunreaktives Protein, das durch kleinzellige Lungentumoren synthetisiert worden sein soll, ein Molekulargewicht von 8.000 bis 16.000 Dalton, was bei Berücksichtigung der unterschiedlichen Isolierungs- und Analysenmethoden als Übereinstimmung mit dem hier gezeigten 17.000 Dalton-Protein gesehen werden kann.

Schlußfolgernd mit Unterstützung durch die bislang bekannten Literaturdaten kann postuliert werden, daß kleinzellige Lungentumoren ein tumorspezifisches Calcitonin-immunreaktives Coreprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 17.000 Dalton synthetisieren. Über Lungentumoren anderer

Histologien kann aus den Ergebnissen, die im Serum dieser Patienten gewonnen wurden, allein keine eindeutige Aussage gemacht werden.

Die qualitative Charakterisierung der Calcitonin-immunreaktiven Proteine durch Affinitätschromatographien an Protein A zeigten, daß die hochmolekularen Calcitonin-immunreaktiven Moleküle nicht durch Interaktion zwischen einem Calcitonin-immunreaktiven Protein mit einem geringeren Molekulargewicht - möglicherweise dem 17.000 Dalton-Protein - und Immunglobulinen entstehen. Hieraus kann geschlossen werden, daß Calcitonin-immunreaktive Proteine keine autoantigene Funktion besitzen und somit wahrscheinlich auch keine immunpathogene Rolle spielen.

Die Resultate der Affinitätschromatographie an Concavalin A-Sepharose, Lentil-Lectin-Sepharose und Wheatgerm-Sepharose zeigen, daß eine Glykoproteinkomponente mit α -D-Mannosyl oder sterisch ähnlichen Zuckerresten in den Calcitonin-immunreaktiven Proteinen nicht nachgewiesen werden kann. Diese Ergebnisse stimmen bedingt - wenn man die unterschiedliche Tumorart vernachlässigt - mit denen von Goltzman und Tischler (43) überein, die in ihren, aus dem Medium von Zellkulturen des C-Zellkarzinoms angereinigten hochmolekularen Calcitonin-immunreaktiven Proteinen ebenfalls keinen Glykoproteinanteil identifizieren konnten. Jacobs et al. (109) zeigten hingegen eine Glykoproteinkomponente in ihrem 17.000 Dalton Translationsprodukt - aus einem zellfreien me-

dulären Schilddrüsenkarzinomssystem. Bei solchen Translationsexperimenten muß jedoch die Frage im Auge behalten werden, inwieweit ein solches vollständig heterologes in vitro C-Zellkarzinom m-RNA-System auf die in vivo-Situation übertragen werden kann. Dies wird um so deutlicher, wenn man ältere Arbeiten derselben Gruppe (112) heranzieht, in denen keine Glykosylierung des Translationsproduktes gezeigt werden konnte. Berücksichtigt man weiterhin die Ergebnisse von Lips et al. (108), die ein 65.000 Dalton Calcitonin-immunreaktives Protein als erstes Translationsprodukt in einem Froschoozyten-system nachweisen konnten, werden die Translationsexperimente weiter relativiert.

Ionenaustauschchromatographien ergaben, daß es mit Hilfe dieser Technik möglich ist, das 17.000 Dalton-Calcitonin-immunreaktive Protein in einem Einschnittverfahren zum überwiegenden Teil von den anderen Calcitonin-immunreaktiven Proteinfraktionen abzutrennen. Es konnte also ein schnelles und effektives Anreicherungsverfahren etabliert werden.

4.2 Charakterisierung von Adrenocorticotropin-immunreaktivem Protein in Serum und Gewebe von Lungentumorpatienten

Erhöhte ACTH-Spiegel im Serum von Lungentumorpatienten, verursacht durch eine ektope Produktion dieses Hormons wurden erstmalig 1969 von Liddle et al. (33) beschrie-

ben. In den letzten Jahren konnte dieses Ergebnis durch andere Autoren bestätigt werden (27, 40, 113), wobei allerdings für erhöhte ACTH-Konzentrationen im Serum Häufigkeiten zwischen 11-72 % der Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom angegeben wurden. Yalow et al. (114) und Gewirtz und Yalow (115) konnten schließlich hochmolekulare ACTH-immunreaktive Strukturen bei Lungentumorpatienten nachweisen. Es schien also, den für das Calcitonin beim Bronchialkarzinom gefundenen Daten ähnlich, hochmolekulares, biologisch inaktives bzw. vom physiologischen abweichend aktives ACTH-immunreaktives Protein durch Lungentumorzellen gebildet zu werden.

Die gegenüber dem Calcitonin geringere Inzidenz ließ diese Proteine vordergründig weniger interessant erscheinen. Andererseits sind die biologischen Wirkungen des von Tumorzellen produzierten Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteins offensichtlich wesentlich vielfältiger und stärker ausgeprägt (27, 44). Nicht zuletzt um Grundlagen für eine bessere Untersuchung dieser biologischen Aktivität zu schaffen, sollte das ACTH bei Lungentumoren in der vorliegenden Arbeit nach dem für das Calcitonin beschriebenen Schema charakterisiert werden, obwohl bereits mehr Daten als für das Calcitonin aus der Literatur bekannt waren (116, 117).

Die affinitätschromatographischen und gelchromatographischen Auftrennungen von Adrenocorticotropin-immunreaktivem Material aus den Seren von Lungentumorpatienten belegten die Heterogenität dieses Proteins im Serum. Wei-

ter konnten die Chromatographien an Concanavalin A-Sepharose einen Glykoproteinanteil mit α -D-Mannopyranose, α -D-Glucopyranose oder sterisch ähnlichen Zuckerresten, bei den im Serum zirkulierenden Proteinen zeigen. Die Molekulargewichtsbestimmungen resultierten in einem mengenmäßig überwiegenden ACTH-immunreaktiven Protein im Molekulargewichtsbereich von 30.000 Dalton und einem weiteren ca. 20 % des ACTH-immunreaktiven Proteins ausmachenden Anteil mit einem Molekulargewicht in der Größenordnung von $\approx$ 100.000 Dalton. Das Auftreten einer Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinfraction mit einem Molekulargewicht von etwa 30.000 Dalton stimmt gut mit den Vorstellungen über das sog. ACTH- β -Lipotropin überein (56, 57, 116) (s. 1.5 und Abb. 2).

Die im Serum gefundenen Proteinfractionen ließen sich auch aus Tumorgewebe voneinander trennen, wobei jedoch die hochmolekulare Proteinfraction mit einem Molekulargewicht von $\approx$ 100.000 Dalton gegenüber der 30.000 Dalton Fraction deutlich vermehrt war. Wieweit das Auftreten einer kleinen Fraction von physiologischem ACTH für kleinzellige Lungentumorextrakte typisch ist, kann nicht beurteilt werden, da insgesamt nur zwei Gewebsextrakte untersucht werden konnten, und nur in einem Fall ein ACTH-immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 4.500 Dalton gefunden werden konnte. Gewirtz und Yalow (115) finden ebenfalls nur in einem Teil der von ihnen untersuchten Tumorgewebs-

extrakte physiologisches ACTH. Worauf die gegenüber dem Serum starke Verschiebung zugunsten der höhermolekularen Fraktion im Tumorgewebe zurückzuführen ist, kann lediglich spekuliert werden. Es könnte eine Aggregation von mehreren Adrenocorticotropin- β -Lipotropin-Molekülen (je 30.000 Dalton) die aufgrund der hydrophoben Eigenschaften dieses Moleküls zustande kommt, vorliegen. Es wäre jedoch auch denkbar, daß es sich um einen in der Literatur immer wieder diskutierten gemeinsamen Vorläufer für Adrenocorticotropin- β -Lipotropin und Calcitonin (118) handelt. Inkubationen der $\approx$ 100.000 Dalton-Fraktion mit SDS, die diese Frage hätten beantworten sollen, führten zu keinem Ergebnis, da es vor allem aus Gründen der geringen ACTH-Konzentration in den Ausgangsmaterialien nicht möglich war, wie bei den Analysen der Calcitonin-immunreaktiven Proteine Polyacrylamid-Gelelektrophoresen für ACTH-immunreaktive Proteine zu etablieren. Erschwerend kam noch hinzu, daß die zur Verfügung stehenden radioimmunologischen Nachweisverfahren für ACTH eine erheblich höhere Störfälligkeit gegenüber Faktoren wie Ionenstärkenschwankungen, Polyacrylamidgelresten, pH-Schwankungen und ähnlichem zeigten, als die Nachweismethoden zur Bestimmung von Calcitonin-immunreaktivem Protein (119, 120).

Eine Grundvoraussetzung für eine zuverlässige weitere Charakterisierung der ACTH-immunreaktiven Proteine beim Bronchialkarzinom schien demnach die Bereitstellung von ausreichend großen Mengen an Ausgangsmaterial zu sein. Da dies in Form von Patientenserum oder Tumorgewebe nicht

möglich war, wurde versucht, auf Zellkulturen überzugehen.

4.3 Die Bedeutung von ACTH- β -Lipotropin-immunreaktiven Proteinen als Autoantigen im Serum von Patienten mit kleinzelligen Lungentumoren

Der Klärung der Frage nach der autoantigenen Rolle von Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen kommt möglicherweise pathogenetische Bedeutung bei. Bei der Pathogenese von Tumoren spielt der Immunstatus des Wirtes eine entscheidende Rolle (121). Nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse entstehen wahrscheinlich in jedem Individuum täglich Krebszellen, die vom Immunsystem des Wirtes als solche erkannt und vernichtet werden, d.h. der Schutz vor malignen Erkrankungen beruht vermutlich zu einem nicht geringen Teil auf einer intakten Immunantwort (11, 122). Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom kommt es in den Randbezirken des Tumors in den meisten Fällen zu keinerlei entzündlichen Reaktionen mit einer Beteiligung von Zellen des Immunsystems. Für diesen Befund bieten sich grundsätzlich zwei pathogenetische Mechanismen als Erklärung an. Zum einen könnte die Antigenität der kleinzelligen Lungentumorzellen so gering sein, daß der Tumor vom Immunsystem des Wirtes nicht erkannt wird und es daher auch zu keinerlei Immunreaktion kommt. Dagegen sprechen jedoch die Befunde, die das Auftreten von Immunkomplexen, gerade bei Patienten mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen beschreiben (123,124). Zum anderen wäre es möglich,

daß das Immunsystem des Wirtes blockiert wird. Dabei könnten zwei, sich gegenseitig verstärkende Mechanismen wirksam werden. Erstens induziert das vom Tumor synthetisierte ACTH eine erhöhte Cortisolausschüttung, die eine immunsuppressive Wirkung haben kann; zweitens werden Antikörper, die gegen das als Oberflächenantigen fungierende, vom Tumor synthetisierte Adrenocorticotropin-immunreaktive Protein gerichtet sind, durch die vom Tumor sekretierten bzw. sich von der Zelloberfläche lösenden Antigene blockiert, wodurch es zur Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen kommt, von denen wiederum eine negative Rückkopplung auf das Immunsystem ausgehen kann.

Bei Untersuchungen über die Rolle von Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen als Autoantigen wurde deutlich, daß Adrenocorticotropin-immunreaktives Protein Bestandteil zirkulierender Immunkomplexe bei Lungentumorpatienten sein kann. Zirkulierende Immunkomplexe bei Tumorpatienten sind von vielen Autoren beschrieben worden (124, 125). Dabei war es bisher mit Ausnahme der Marburger Arbeitsgruppe noch keiner anderen Gruppe gelungen, ein Antigen in diesen Komplexen zu identifizieren. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Protein Aminisäulenverfahren erlaubt erstmals eine systematische Analyse einer größeren Anzahl von Patientenserum. Zu bedenken bleibt bei diesen Ergebnissen jedoch, daß die affinitätschromatographischen Versuche, besonders die mit Anti-ACTH-Sepharose, zwar eine relativ feste, sta-

bile Bindung zwischen Immunglobulin und Adrenocorticotropin-immunreaktivem Protein belegen und somit einen Hinweis auf eine spezifische Antigen-Antikörper-Bindung geben, daß sie jedoch keinen endgültigen Beweis für einen spezifischen Anti-ACTH-ACTH-Immunkomplex liefern. Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit vorgelegten experimentellen Befunde ließe sich der Einwand, daß es sich bei den an das Affinitätsgel gebundenen Proteinkomplexen um eine unspezifische Assoziation von bei Patienten mit Lungentumoren zirkulierenden Immunkomplexen und vom Tumor synthetisierten Adrenocorticotropin-immunreaktiven Proteinen handeln könnte, zwar entkräften, jedoch nicht endgültig widerlegen. Der endgültige Beweis für einen spezifischen Adrenocorticotropin-Immunkomplex wäre erst durch ein Rekombinationsexperiment zu erbringen. Zu diesem Zweck müßten Immunkomplexe in ihre Bestandteile zerlegt werden, d.h. in Antikörper und Antigen, und anschließend wieder erfolgreich rekombiniert werden. Trotz zahlreicher Versuche ist dies bislang keiner der auf diesem Gebiet arbeitenden Gruppen gelungen (126). Ein Grund für das Scheitern derartiger Versuche liegt, wie bei der Charakterisierung des ACTH-immunreaktiven Proteins, in der Schwierigkeit der Beschaffung von genügend Ausgangsmaterial zur Isolierung der Immunkomplexe. Theoretisch besteht zwar die Möglichkeit durch Plasmapherese große Mengen an Serum zu gewinnen, aus dem die Komplexe zunächst mit proteinchemischen Methoden wie Fällung und Gelfiltration iso-

liert werden könnten. Bei einer vorsichtigen Spaltung der Komplexe, möglichst ohne pH-Verschiebungen, sollten anschließend aussagekräftige Rekombinationsexperimente durchgeführt werden können (127).

Durch affinitätschromatographische Bindungsversuche an anti-Clq-Sepharose könnte die lange diskutierte Frage, inwieweit Immunkomplexe keine Clq-Bindungsfähigkeit besitzen und deshalb im Serum zirkulierend eine pathogene-tische Bedeutung haben, einer Klärung näher gebracht werden. Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der pathogene-tischen Bedeutung der ACTH-immunreaktiven Immunkomplexe bei Lungentumoren liegt in der Etablierung von Zellkulturen. Auf diese Weise stände ein von Tumorzellen synthetisiertes ACTH-immunreaktives Protein zur Verfügung, das noch nicht unter der Einwirkung des humoralen Abwehrsystems des Patienten gestanden hat. Bindungsstudien zwischen so gewonnenen Antigenen und Immunglobulinfraktionen aus Patientenserum könnten im Vergleich zu den aus Patientenserum isolierten Antigenen weitere Aufschlüsse über mögliche Wechselwirkungen von Tumor und Immunsystem geben. Weiterhin könnte der Einfluß des vom Tumor synthetisierten Antigens auf die Bindungsfähigkeit von Antikörpern an die Oberflächen der Antigen-produzierenden Zellen untersucht werden (128, 129).

4.4 Untersuchungen an Adrenocorticotropin- und Calcitonin- Immunreaktivität synthetisierenden Tumorzelllinien

Es konnte gezeigt werden, daß das aufwendige Verfahren der Elablierung von Tumoren in nackten Nagetieren zwar einen wertvollen Ansatz, besonders unter dem Aspekt von Arbeiten in größerem Maßstab, darstellt, jedoch für die vorliegende Fragestellung primär ein zu langwieriges Verfahren war.

Die direkte Inkulturnahme von Tumorgewebe oder Tumorzellen aus malignen Ergüssen führte wesentlich schneller zu den gewünschten Ergebnissen. Hier gelang es sogar, einen größeren Anteil der Gewebeproben erfolgreich in Kultur zu bringen, als in der Literatur (20-40 %) angegeben (83). Das Hauptproblem der direkten Kultur war die Erlangung einer Zellpopulation, die mit großer Wahrscheinlichkeit von dem Zelltyp abstammte, der den Hauptanteil des Ausgangstumors ausmachte. Die Herstellung und Erhaltung einer homogenen Zellpopulation konnte durch regelmäßiges Klonieren gewährleistet werden, wobei ein effektives, leicht zu handhabendes Screening-System für Tumorzellen die Voraussetzung für ein erfolgreiches Klonieren darstellte, da bei schnell wachsenden Kulturen die Anzahl der weiter zu kultivierenden Klone schnell Größenordnungen erreicht, die technisch nicht mehr zu bewältigen sind. Im Rahmen der vorliegenden Problemstellung konnte als Kriterium bei der Klonierung die Hormonproduktion der Zellen verwendet werden, da nicht-

hormonproduzierende Tumorzellen im Rahmen der Fragestellung von geringerem Interesse waren. Ein weiteres Auswahlkriterium stellte natürlich die Proliferationsgeschwindigkeit dar, da zu langsam wachsende Zelllinien dem Ziel einer Produktion von großen Mengen an Peptidhormon-immunreaktiven Proteinen nicht entgegen gekommen wären. Durch die Klonierung gelang es schließlich, einige vollständig fibroblastenfreie Zellkulturen zu gewinnen. Es zeigte sich jedoch, daß einige Lungentumorzellen auf die Gegenwart von Fibroblasten angewiesen sind um zu proliferieren. Dieser Befund ist von einigen Autoren (130) für kleinzellige Lungentumorzellen bereits beschrieben worden, erscheint jedoch auch für großzellige und Plattenepithel-Lungentumoren Gültigkeit zu haben. Worauf diese Abhängigkeit von Tumorzellen von nicht malignen Zellen beruht, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Es kann lediglich spekuliert werden, daß Fibroblasten Faktoren synthetisieren, die für die Proliferation der Tumorzellen notwendig bzw. vorteilhaft sind, zumal die natürliche Umgebung der Tumoren ebenfalls reich an Fibroblasten ist.

Ein weitaus schwierigeres Problem war die Charakterisierung der Zellkulturen im Vergleich zum Ausgangsmaterial (130). Sie ließ sich am besten und sichersten bei Kulturen aus malignen Ergüssen durchführen, da hier aus dem Gewebeverband herausgelöste einzelne Zellen morphologisch verglichen werden konnten (vergl. Abb.31 u. Abb.33). Histologische Präparate dagegen enthalten häufig Tumorzellen,

die unterschiedlichen histologischen Typen zuzuordnen sind; d.h. kleinzellige Tumoren beispielsweise enthalten häufig Plattenepithel- und großzellige Tumoreareale, die von etlichen kleinzelligen Karzinomstrukturen umgeben sind (131, 132). Unter anderem auf diese Befunde stützen sich die Theorien, die davon ausgehen, daß Lungentumoren aller Histologien sich von einer Stammzelle entwickeln und es mehr oder weniger eine Frage der transformierenden Ereignisse und des jeweiligen Selektionsdruckes ist, was für ein histologischer Typ eines Karzinoms sich entwickelt (133). Pathologische Untersuchungen bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen konnten zeigen, daß 6 % aller unbehandelten als kleinzellig diagnostizierten Bronchialkarzinome auch Plattenepithelzellen und andere Zellen enthalten (131). Nach einer Chemo- und Strahlentherapie zeigten im Autopsiematerial 39 % dieser kleinzelligen Bronchialkarzinome nicht kleinzellige Anteile (134). In einigen Fällen hatte das verbleibende Tumorgewebe sogar keine kleinzelligen Anteile mehr und hatte eine vollständige histologische Veränderung zu einem der anderen Tumortypen durchgemacht (134). Diese Befunde könnten einerseits durch ein bevorzugtes Wachstum schon vorhandener minimaler Anteile nicht kleinzelliger Zellen erklärt werden. Eine andere Interpretation wäre eine weitere Transformation zu Adeno-, Plattenepithel- oder großzelligen Karzinomen. Für die letztere Annahme sprechen die Daten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gefunden werden konnten und die zunächst durchaus problematisch erschienen: die morpholo-

gischen Veränderungen von permanenten Zelllinien zu anderen Histologien hin. Dieses Phänomen ist besonders bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen beobachtet worden, wo in der Kultur, zum Teil nach 12 Monaten und über 50 Passagen morphologische Veränderungen auftraten, die dazu führten, daß die entstehende Linie als großzellig einzustufen war (130). Aber auch aus flottierend wachsenden Plattenepithelkarzinomzellkulturen, die über 8 Monate hinweg einheitlich wachsende Zellen enthielten, entwickelten sich spontan zwei adhärent wachsende Zellpopulationen.

Diese Ergebnisse zeigen im Vergleich mit den o.g. Autopsiebefunden, daß eine ganz sichere und durchgehende Zuordnung einer Zelllinie zu einer Lungenkarzinomhistologie problematisch sein kann. Dennoch stellen diese Zelllinien ein gutes Ausgangsmaterial für vergleichende Untersuchungen von Regulationsmechanismen dar.

4.5 Charakterisierung der von Lungentumorzelllinien synthetisierten und ins Kulturmedium abgegebenen Calcitonin-immunreaktiven und Adrenocorticotropin- β -Lipotropin-immunreaktiven Proteine

Die Ergebnisse zur biochemischen und immunologischen Charakterisierung der von Lungentumorzellkulturen synthetisierten Calcitonin- und ACTH-immunreaktiven Proteine zeigen, daß es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um dieselben Proteine handelt, die im Serum und im Tumorgewebe von Lungentumorkranken beschrieben werden konnten, so daß diese Kulturen tatsächlich ein gutes Ausgangsmaterial für wei-

tere Untersuchungen zur biochemischen und immunologischen Natur dieser Proteine darstellen. Vergleicht man kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien mit Serum und Tumorgewebe von Patienten mit kleinzelligen Lungentumoren ergibt die Gelfiltration an AcA 54 des Kulturmediums ein Profil der Calcitonin-immunreaktiven Proteine, das eine größere Ähnlichkeit mit den Ergebnissen aus Tumorgewebeextrakten zeigt als mit den aus Patientenserum gewonnenen Daten. Dies legt die Vermutung nahe, daß die quantitativen Unterschiede, die zwischen Tumorgewebe und Serum zu beobachten waren, auf den Einfluß von Serumproteasen zurückzuführen sind, und nicht den Ausdruck einer Modifikation während der Ausschleusung aus der Zelle darstellen.

Ein deutlich anderes Profil zeigen Gelfiltrationen der Calcitonin-immunreaktiven Proteine aus den Kulturmedien von Plattenepithelkarzinom-Zelllinien. Ein Vergleich mit Tumorextrakten und Patientenserum konnte nicht durchgeführt werden, da einerseits zur Gewinnung eines Tumorextraktes keine ausreichenden Tumormengen zur Verfügung standen und die Konzentrationen an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom nicht ausreichten, um erfolgreich Gelfiltrationen durchführen zu können. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß sich auch die aus dem Kulturmedium einer Plattenepithelzellkultur isolierte hochmolekulare Calcitonin-immunreaktive Proteinfraktion in der SDS-Elektrophorese genau wie die hochmolekulare Fraktion aus dem Kulturmedium eines

kleinzelligen Bronchialkarzinoms zu einem Molekulargewicht von ca. 17.000 Dalton spalten ließ. Dieser Befund zeigt zwar, daß es nicht möglich ist, wie zu Beginn der Arbeit vermutet, mit dem 17.000 Dalton Calcitonin-immunreaktiven Protein einen Parameter zu beschreiben, der eine sichere Differenzierung zwischen kleinzelligen und nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen ermöglicht. Die Beschreibung eines solchen, die morphologischen Analysen des Pathologen unterstützenden Parameters hätte einen wichtigen diagnostischen Fortschritt bedeutet (135), wenn die schlechten Prognosen kleinzelliger Lungentumoren bedacht werden. Andererseits liefert dieser Befund einen Beitrag zum z.Zt. diskutierten Ursprung der Lungentumoren (136,137). Zusammen mit den morphologischen Befunden (4.4) und den Ergebnissen von Pettengill und Sorenson (130) können diese Zellkulturdaten als Hinweis darauf gewertet werden, daß zumindest kleinzellige, großzellige und Plattenepithelbronchialkarzinome sich von einem gemeinsamen Zelltyp ableiten, ineinander übergehen können und daß sowohl morphologisch wie auch biochemisch charakterisierbare Übergangsformen zu existierenscheinen. Die Biosynthese eines 17.000 Dalton Calcitonin-immunreaktiven Proteins scheint, soweit es sich aus einem Querschnitt von 30 Zellkulturen, die z.T. nur übereinen relativ kurzen Zeitraum hinweg kultiviert werden konnten, schließen läßt, keine spezifische Eigenschaft von kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu sein, sondern eine Potenz aller Bronchialtumoren darzustellen.

Die unterschiedlichen Konzentrationen an Calcitonin-immunreaktiven Proteinen im Serum von Patienten mit Lungentumoren könnten demnach Ausdruck von quantitativen Unterschieden im Anteil hormonproduzierender Zellen in einem soliden Tumor sowie von verschiedenen Proliferationsgeschwindigkeiten dieser Zellen (schnellwachsende kleinzellige Bronchialkarzinome) (138) sein.

Eine Erklärung dafür, daß in Zellkulturen im Gegensatz zum in vivo System kleinzellige Bronchialkarzinome gegenüber Plattenepithelkarzinomen eher eine niedrigere Syntheseleistung von Calcitonin-immunreaktiven Proteinen zeigen (139), könnte in der sehr unterschiedlichen in vivo und in vitro Proliferation dieser beiden Lungentumore liegen. Kleinzellige Bronchialkarzinome sind in vivo durch eine schnellere Proliferation bei gleichzeitig hoher Absterberate von Tumorzellen gekennzeichnet (1.3). In der Zellkultur hingegen sind die Verdopplungszeiten der Zellen bis zu 10 mal so hoch wie bei Plattenepithelkarzinom Zellkulturen. Dies kann einerseits daran liegen, daß die Kulturbedingungen für kleinzellige Bronchialkarzinomzellen nicht optimal sind. Vielleicht fehlen das Wachstum positiv beeinflussende Faktoren. Einen Hinweis in dieser Richtung ergaben die Befunde einer Abhängigkeit der kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen von Fibroblasten (3.15). Zum anderen ist sicher auch die Tatsache entscheidend, daß alle bisher kultivierten kleinzelligen Bronchialkarzinome cytostatisch vorbehandelt wa-

ren. Sorenson et al. (103) beschrieben, daß eine solche kleinzellige Bronchialkarzinom Zellkultur erstmals nach einer Kulturdauer von 16 Monaten nachweisbare Mengen an Peptidhormon-immunreaktiven Proteinen synthetisierte.

Die von Lungentumorzelllinien ins Kulturmedium abgegebenen ACTH-immunreaktiven Proteine scheinen genau wie die Calcitonin-immunreaktiven Proteine mit denen im Serum bzw. Tumorextrakt beschriebenen immunreaktiven Proteinen übereinzustimmen. Einschränkend bleibt hier jedoch zu sagen, daß es vorläufig auch bei den ins Kulturmedium von Lungentumorzelllinien abgegebenen ACTH-immunreaktiven Proteinen nicht möglich war, diese durch Inkubation mit SDS in mögliche Untereinheiten zu zerlegen und diese dann im Polyacrylamid-Gradientengel voneinander zu trennen.

Im Kulturmedium konnte eine ACTH-immunreaktive Proteinfraction beschrieben werden (s. Abb. 38), die weder aus dem Serum von kleinzelligen Lungentumorpatienten noch aus Tumorgewebsextrakten isoliert werden konnte. Diese Differenz ist allenfalls dadurch zu erklären, daß diese Proteinfraction gegenüber proteolytischem Abbau besonders empfindlich ist und dadurch sowohl im Serum von Lungentumorpatienten schnell abgebaut wird als auch bei durch Autopsie gewonnenem Ausgangsmaterial für Tumorextraktionen durch die nach dem Tod des Patienten einsetzende Proteolyse abgebaut wird. Mains und Eipper (57) konn-

ten ebenfalls ein ACTH- β -Lipotropin-immunreaktives Intermediärprodukt mit einem Molekulargewicht von 23.000 bei der ACTH-Biosynthese in Hypophysentumoren nachweisen.

Eine Bestätigung der in der Einleitung geäußerten Vermutung, daß es sich bei den von den Tumorzellen synthetisierten und in die Zirkulation abgegebenen ACTH-immunreaktiven Proteinen um ACTH- β -Lipotropin Vorläufermoleküle handeln könnte, ergibt sich aus dem weitestgehend parallelen Verlauf von ACTH- und β -Lipotropin-Immunreaktivität der durch Gelfiltration aufgetrennten Kulturmedien (s. Abb. 38). Es kann also davon ausgegangen werden, daß die höhermolekularen Formen der ACTH-immunreaktiven Proteine neben den Antigenbindungsstellen für Antikörper gegen ACTH auch β -Lipotropin-Antigenbindungsstellen enthalten. Nach den vorliegenden Ergebnissen synthetisieren Lungentumorzellen, die von Mains und Eipper (56) , Nakanishi et al. (55) und anderen Autoren (140) beschriebenen Intermediärprodukte der ACTH-Biosynthese und schleusen diese wahrscheinlich infolge eines durch die maligne Entartung gestörten Abbaus aus.

Da es sich bei den von Lungentumorzelllinien ins Kulturmedium abgegebenen Calcitonin- und ACTH- β -Lipotropin-immunreaktiven Proteinen mit hoher Wahrscheinlichkeit um dieselben Proteine handelt, die auch im Serum der Lungentumorkranken beschrieben werden konnten, können die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Lungentumorzelllinien ein in vitro Modell der Peptidhormonbiosynthese von Lungentumorzellen darstellen.

4.6 Bedeutung der vorgestellten Daten für Diagnose und Pathogenese von Lungentumoren

Durch die Versuche der vorliegenden Arbeit gelang es, einerseits die Grundlagen für die Etablierung spezifischer Bestimmungen der vom Tumor synthetisierten Peptidhormon-immunreaktiven Proteine zu legen, andererseits, durch einen besseren Einblick in die molekularen Gegebenheiten, die in der Einleitung dargelegten Erwartungen an solche Bestimmungen zu modifizieren:

Grundsätzlich können alle Lungentumoren Calcitonin und/oder ACTH synthetisieren, eine Diagnostik einer bestimmten, histologisch definierten Tumorart ist also nicht zu erwarten. Es kann geschlossen werden, daß die verschiedenen histologischen Strukturen der Lungentumoren durch Selektionsdruck aus einer Stammzelle entstehen (137).

Die Erfassung eines größeren Prozentsatzes an Lungentumorpatienten durch einen tumorspezifischen Calcitonintest bleibt möglich, da ein eindeutig vom physiologischen Calcitonin unterschiedliches 17.000 Dalton Tumoralcalcitonin gezeigt werden konnte.

Hierfür dürfen jedoch einige grundsätzliche biochemische Überlegungen nicht außer acht gelassen werden: Es ist insgesamt gesehen recht unwahrscheinlich, selbst wenn es gelänge, einen spezifischen immunologischen Test gegen ein von Lungentumoren synthetisiertes und in die Zirkulation abgegebenes Protein zu entwickeln, mit diesem eine echte Frühdiagnose durchzuführen zu können (143, 144). Dies wird

um so zweifelhafter, je früher ein Tumor zur Metastasierung neigt. Geht man bei Tumorzellen von einer im Bereich der normalen Proteinbiosynthese liegenden Stoffwechselaktivität sowie einer durchschnittlichen Sekretion der als "Marker" verwendeten Proteine aus, müßte ein Tumor wie das Beispiel des CEA (Carcinoembryonales Antigen) beim Lungenkarzinom zeigt (145),, 5×10^9 bis 5×10^{11} stoffwechselaktive Zellen haben, die Syntheseprodukte in die Zirkulation abgeben, um dort, selbst mit hochempfindlichen immunologischen Tests, diese Stoffwechselprodukte nachweisen zu können. Damit hätte der Tumor bereits eine Größe erreicht, in der er auch mit klinischen Methoden zu erfassen wäre und bei der zumeist bereits eine Metastasierung vorliegt. Diese eher pessimistisch stimmenden Überlegungen über die Chancen einer Früherkennung verbessern sich, wenn man Tumoren endokrinen Ursprungs oder die sekretorische Leistung von Drüsenzellen mit in die Überlegungen einbezieht. Hierbei würden 1×10^9 stoffwechselaktive Tumorzellen ausreichen, um einen Serumspiegel von $1 \mu\text{g/ml}$ zu erzeugen. Im allergünstigsten Fall könnten mit Hilfe eines spezifischen nicht kompetitiven Tests (sichere Nachweisgrenze 100 pg) und bei einer Halbwertszeit des zu bestimmenden Proteins von 10 Std. 1×10^5 aktive Tumorzellen nachgewiesen werden. Wenn es auch unrealistisch ist, solch günstige Voraussetzungen zur Ar-

beithypothese zu erheben, zeigen Beispiele von Tumoren endokrinen Ursprungs, daß dort für eine Frühdiagnose so günstige Verhältnisse vorliegen können (s. 1.4). Diese Verhältnisse könnten auch auf Lungentumoren zutreffen, da zahlreiche Autoren der Ansicht sind, daß sich zumindest das kleinzellige Bronchialkarzinom von den sogenannten K-Zellen (endokrine Zellen der Lunge) ableitet (136, 146).

Tumor-ACTH scheint sich vom physiologischen ACTH-Prohormon kaum zu unterscheiden, vor allem aber in so geringen Konzentrationen aufzutreten, daß es als serologischer Parameter für die Früherkennung in den Hintergrund des Interesses treten sollte. Aus pathophysiologischer Sicht konnte es jedoch durch seine Wirkung als Autoantigen weiterhin als sehr interessantes Protein gezeigt werden.

Durch die Zellkulturen sind die Voraussetzungen für die Untersuchung der Wirkung der Autoantikörper auf das zelluläre Immunsystem geschaffen worden: Bei der Untersuchung der antikörpervermittelten zellulären Cytotoxizität könnten die Tumorzelllinien als Zielzellen eingesetzt werden (141, 142).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es, im Serum und Tumorgewebe von Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom mit Hilfe einer für die immunologische Bestimmung optimierten Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophoresetechnik ein tumorspezifisches Calcitonin-immunreaktives Protein mit einem Molekulargewicht von 17.000 Dalton zu beschreiben. Dieses Protein mit einem isoelektrischen Punkt von 5,5 bis 6,0 zeigte Stabilität gegenüber proteolytischen Aktivitäten, enthielt keine Glykoproteinkomponente und zeigte keine autoantigene Wirksamkeit.

Im Serum und Tumorgewebe derselben Patienten konnten ACTH-immunreaktive Proteine mit Molekulargewichten von ≥ 100.000 und 30.000 und einem Kohlenhydratanteil nachgewiesen werden. Über eine autoantigene Wirkung haben diese Proteine möglicherweise pathogenetische Bedeutung.

Durch Serienuntersuchungen an Lungentumorpatienten konnte gezeigt werden, daß spezifische immunologische Tests gegen die von Lungentumorzellen sezernierten Calcitonin-immunreaktiven Proteine große Bedeutung in Diagnose und Therapiekontrolle bei Lungentumorerkrankungen erlangen könnten.

Die Etablierung von Peptidhormon-synthetisierenden permanenten Lungentumorzelllinien, in deren Kulturmedien die im Patientenserum und -gewebe beschriebenen Peptidhormone ebenfalls charakterisiert werden konnten, legte die Grundlagen

für die Entwicklung einer derartigen spezifischen Bestimmungsmethode. Mit Hilfe der Zellkulturen gelang es außerdem zu zeigen, daß die hochmolekularen ACTH-immunreaktiven Proteine große Ähnlichkeit mit den in der Literatur für Hypophysengewebe bzw. Hypophysentumoren beschriebenen ACTH- β -Lipotropin Vorläufermolekülen haben.

Anhand der Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, daß nicht nur kleinzellige Lungentumoren, wie es nach den Untersuchungen im Serum erschien, sondern Lungentumoren aller Histologien die Fähigkeit zur Biosynthese tumorspezifischer Peptidhormone besitzen, so daß die Relevanz eines spezifischen Tests noch erweitert werden konnte.

6. LITERATUR

1. HAYES, H.M., jr. (1978) The comparative epidemiology of selected neoplasms between dogs, cats, and humans. Eur.J.Cancer 14, 1299-1308
2. SANDRITTER, W. und BENEKE, G. (1974) Allgemeine Pathologie Schattauer Verlag, Stuttgart
3. BONNADONNA, G. und SANTORO, A. (1982) Evolution in the treatment strategy of Hodgkin's disease. Adv. in Cancer Res. 36, 257-293
4. EINHORN, L.M. und DONOHUE, J. (1977) Cis-diaminedichloro platinum, Vinblastine and Bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. Ann. Intern. Med. 87, 293-298
5. RIGBY, P.W.J. (1982) The oncogenic circle closes. Nature 297, 451-453
6. BECKER, D., LANE, M.A. and COOPER, G.M. (1982) Identification of an antigen associated with transforming genes of human and mouse mammary carcinomas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3315-3319
7. KARLSON, P. (1982) Wie entstehen Krebszellen? Naturwiss. Rundschau 35, 356-365
8. YOSHIMOTO, T., INOUE, T., IIZUKA, H., NISHIKAWA, H., SAKATANI, M., OGURA, T., HIRAO, F., und YAMAMURA, Y. (1980) Differential induction of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in mouse lung by intratracheal instillation of benzo(a) pyrene and charcoal powder. Cancer Research 40, 4301-4307
9. DEVARE, S.G., REDDY, E.P., ROBBINS, K.C., ANDERSEN, P.R., TRONICK, S.R., und AARONSON, S.A. (1982) Nucleotide sequence of the transforming gene of simian sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3179-3182

10. SCHOTTENFELD,D. (1981) The epidemiology of cancer: an overview. *Cancer*, 47, 1095-1108
11. FIDLER,I.J. und HART,I.R. (1982) Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science*, 217, 998-1003
12. HUNTER,T. (1980) Proteins phosphorylated by the RSV transforming function. *Cell* 22, 647-653
13. HYNES,N.I., KENNEDY,N.,RAHMSDORF,U., und GRONER,B. (1981) Hormone-responsive expression of an endogeneous proviral gene of mouse mammary tumor virus after molecular cloning and gene transfer into cultured cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 2038-2042
14. WHANG-PENG,J., KAO-SHAN,C.S., LEE,E.C., BUNN,P.A., CARNEY,D.N., GAZDAR,A.F., und MINNA,J.D. (1982) Specific chromosome defect associated with human small-cell lung cancer: deletion 3p(14-23). *Science* 215, 181-182
15. VINDELOV,L.L., HANSEN.H.H., CHRISTENSEN,I.J., SPANG-THOMSEN, M., HIRSCH,F.R., HANSEN,M., und NISSEN,N.I. (1980) Clonal heterogeneity of small cell anaplastic carcinoma of the lung demonstrated by flow-cytometric DNA analysis. *Cancer Research* 40, 4295-4300
16. BRERETON,H.D., MATTHEWS,M.J. und COSTA,J. (1978) Mixed anaplastic small-cell carcinoma of the lung. *Ann. Int. Med.* 88, 805-806
17. ROTH,J.A.,GRIMM,E.A., GUPTA,R.K.,und AMES,R.S. (1982) Immunoregulatory factors derived from human tumors: I. Immunologic and biochemical characterization of factors that suppress lymphocyte proliferative and cytotoxic responses in vitro. *J. Immunol.* 128, 1955-1962

18. DISTEFANO, J.F., BECK, G., LANE, B., und ZUCKER, S. (1982)
Role of tumor cell membrane-bound serine proteases in
tumor-induced target cytolysis. *Cancer Research* 42, 207-218
19. MARQUARDT, H. und TODARO, G.J. (1982) Human transforming
growth factor. *J. Biol. Chem.* 257, 5220-5225
20. TWARDZIK, D.R., RANCHALIS, J.E. und TODARO, G.J. (1982)
Mouse embryonic transforming growth factors related to
those isolated from tumor cells. *Cancer Research* 42, 590-593
21. STANBRIDGE, E.J., DER, C.J., DOERSEN, C.J., NISHIMI, R.Y.,
PEEHL, D.M., WEISSMAN, B.E., und WILKINSON, J.E. (1982)
Human cell hybrids: analysis of transformation and tumori-
genicity. *Science* 215, 252-259
22. SANDRITTER, W. (1964) Cytophotometrische Untersuchungen am
Portiocarcinom und seinen Vorstufen. *Verh. dtsh. Ges.
Path.* 48, 34-43
23. BÖHM, N. und SANDRITTER, W. (1975) DNA in human tumors: A
cytophotometric study. *Current Topics in Pathology* 60,
153-259
24. OTT, G., KUTTIG, H. und DRINGS, P. (1982) Standardisierte
Krebsbehandlung. Springer Verlag, Berlin, New York
25. NEUMANN, G. (1982) Der Trend der Tumorfrequenz und mög-
liche Beziehungen zu Früherkennungsmaßnahmen. *Fortschr.
Med.* 100, 1073-1078
26. GROPP, C. und HAVEMANN, K. (1980) Was ist gesichert in der
Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms? *Internist*
21, 705-710
27. MERRILL, W.W. und BONDY, P.K. (1982) Production of biochemical
marker substances by bronchogenic carcinomas. *Clinics in
Chest Medicine* 3, 307-320

28. NOLTENIUS, H. (1981) Systematik der Onkologie: Klassifizierung, Morphologie, Klinik. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, Band 1, 681-731
29. KREYBERG, L., LIEBOW, A.A. und UEHLINGER, E.A. (1967) Histological typing of lung tumors. World Health Organisation, Genf
30. EAGAN, R.T., MAURER, L.H., FORCIER, R.J. und TULLOH, M. (1974) Small cell carcinoma of the lung: staging, paraneoplastic syndromes treatment and survival. Cancer 33, 527-532
31. ROSWIT, B., PATNO, M.E. und RAPP, R. (1968) The survival of patients with inoperable lung cancer: a large-scale randomized study of radiation therapy versus placebo. Radiology 90, 688-701
32. ALBERTO, P., BRUNNER, K.W., MARTZ, G., OBRECHT, I.P. und SONNTAG, R.W. (1976) Treatment of bronchogenic carcinoma with simultaneous or sequential combination chemotherapy including methotrexate, cyclophosphamide, procarbazine, and vincristine.. Cancer 38, 2208-2216
33. LIDDLE, G.W., NICHOLSON, W.E., ISLAND, D.P., ORTH, D.N., ABE, K. und LOWDER, S.C. (1969) Clinical and laboratory studies of ectopic humoral syndromes. Recent Prog. Horm. Res. 25, 283-305
34. GROPP, C., HAVEMANN, K. und SCHEUER, A. (1980) Ectopic hormones in lung cancer patients at diagnosis and during therapy. Cancer 46, 347-354
35. GROPP, C., HAVEMANN, K., KALBFLEISCH, H., LUSTER, W. und SOSSTMANN, H. (1982) Antidiuretisches Hormon bei Patienten mit Bronchialkarzinom. DMW 107, 974-977

36. SILVA, O.L., BECKER, K.L., PRIMACK, A., DOPPMAN, I. und SNIDER, R.H. (1974) Ectopic secretion of calcitonin by oat-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 290, 1122-1124
37. LUSTER, W., GROPP, C., SOSTMANN, H., KALBFLEISCH, H. und HAVEMANN, K. (1982) Demonstration of immunoreaktive calcitonin in sera and tissues of lung cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18, im Druck
38. PODMORE, J., WILSON, B., Cowden, E.A., BEASTALL, G.H. und RATCLIFF, J.G. (1979) Multiple hormones in human tumors. In: *Carcinoembryonic Proteins. Chemistry, biology, clinical application*. Vol. 1. Ed.: LEHMANN, F.G., Elsevier Biomed. Press, Amsterdam, New York, 457-463
39. TURKINGTON, R.W. (1971) Ectopic production of prolactin. *N. Engl. J. Med.* 285, 1455-1458
40. COSCIA, M., BROWN, R.D., MILLER, M., TANAKA, K., NICHOLSON, W.E., PARKS, K.R. und ORTH, D.N. (1977) Ectopic production of antidiuretic hormone (ADH), adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and beta-melanocyte stimulating hormone (β -MSH) by an oat-cell carcinoma of the lung. *American J. Med.* 62, 303-307
41. HORAI, T., NISHIHARA, H., TATEISHI, R., MATSUDA, M., und HATTORI, S. (1973) Oat-cell carcinoma of the lung simultaneously producing ACTH and serotonin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37, 212-219
42. HANSEN, M. und HUMMER, M. (1979) Ectopic hormone production in small cell carcinoma. In: *Lung Cancer Progress in Therapeutic Research*. Eds.: MUGGIA, F. und ROSENZWEIG, M., Raven Press, New York, 199-207

43. GOLTZMAN,D. und TISCHLER,A.S. (1978) Characterization of calcitonin released by medullary thyroid carcinoma in tissue culture. J. Clin. Invest. 61, 449-458
44. HAVEMANN,K. und GROPP,C. (1980) Ektope Hormonproduktion beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Internist 21, 84-94
45. OLD,L.J. (1981) Cancer immunology: the search for specificity. Cancer Research 41, 361-375
46. HAVEMANN,K., GROPP,C., SCHEUER,A., SCHERFE,T. und GRAMSE,M. (1979) ACTH-like activity in immune complexes of patients with oat-cell carcinoma of the lung. Brit. J. Cancer 39, 43-50
47. COPP,D.H., CAMERON,E.C., CHENEY,B.A., RAVISHON,A.G.F. und HENZE,K.G. (1962) Evidence for calcitonin - new hormone from parathyroid that lowers blood calcium. Endocrinology 70, 638-653
48. RINIKER,B., NEHER,R., MAIER,R., KAHNT,F.W., BYFIELD,P.G.H., GUTMUNDSSON,T.V., GALANTE,L. und MacINTYRE,I. (1968) Menschliches Calcitonin. I. Isolierung und Charakterisierung. Helv. Clin. Acta 51, 1738-1742
49. ZIEGLER,R. (1974) Calcitonin. Thieme Verlag, Stuttgart
50. SILVA,O.L., SNIDER,R.H. und BECKER,K.L. (1974) Radioimmunoassay of calcitonin in human plasma. Clin. Chem. 20, 337-339
51. RAUE,F. (1981) Interlaboratory comparison of radioimmunological calcitonin determination. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 157-161
52. JULLIENNE,A., SEGOND,N., CALMETTES,C., MOUKHTAR,M.S. und MILHAUD,G. (1980) Biosynthesis of human calcitonin: evidence for a prohormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 932-937

53. BAYLIN, S.B., WIEMAN, K.C., O'NEIL, J.A. und ROOS, B.A. (1981) Multiple forms of human tumor calcitonin demonstrated by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and lectin affinity chromatography. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53, 489-495
54. SILVA, O.L., BRODER, L.E., DOPPMAN, J.L., SNIDER, R.H., MOORE, C.F., COHEN, M.H. und Becker, K.L. (1979) Calcitonin as a marker for bronchogenic cancer. *Cancer* 44, 680-684
55. NAKANISHI, S., INOUE, A., KITA, T., NAKAMURA, M., CHANY, A.C.Y., COHEN, S.N. und NUMA, S. (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin- β -lipotropin precursor. *Nature* 278, 423-427
56. MAINS, R.E., EIPPER, B.A. und LING, N. (1977) Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 3014-3018
57. MAINS, R.E. und EIPPER, B.A. (1977) Coordinate synthesis of corticotropins and endorphins by mouse pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.* 253, 651-655
58. TAKAHASHI, H., TERANISHI, Y., NAKANISHI, S. und NUMA, S. (1981) Isolation and structural organisation of the human corticotropin- β -lipotropin precursor gene. *FEBS Let.* 135, 97-102
59. CRINE, P., GIANOULAKIS, C., SEIDAH, N.G., GOSSARD, F., PEZALLA, P.D. und CHRETIEN, M. (1978) Biosynthesis of β -endorphin from β -lipotropin and a larger molecular weight precursor in rat pars intermedia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4719-4722
60. TANAKA, K., NICHOLSON, W.E. und ORTH, D.N. (1978) The nature of the immunoreactive lipotropins in human plasma and tissue extracts. *J. Clin. Invest.* 62, 94-104

61. WOLFSEN, A.R. und ODELL, W.D. (1979) ProACTH: use for early detection of lung cancer. *Am. J. Med.* 66, 765-772
62. GAZDAR, A.F., CARNEY, D.N., GUCCION, J.G. und BAYLIN, S.B. (1981) Small cell carcinoma of the lung: cellular origin and relationship to other pulmonary tumors. In: *Small cell lung cancer*. Eds.: GRECO, F.A., OLDHAM, R.K. und BUNN, P.A., Grune and Stratton, New York, London, Toronto, 135-175
63. WEISS, C. (1976) Funktion des Blutes. In: *Einführung in die Physiologie des Menschen*. Hersg.r SCHMIDT, R.F. und THEWS, G., Springer, Heidelberg, 333-338
64. BERSON, S.A. und YALOW, R.S. (1968) Radioimmunoassay of ACTH in Plasma. *J. Clin. Invest.* 47, 2725-2750
65. AUBERT, M.L. und FELBER, J.P. (1969) Actual aspects of the radioimmunological determination of plasma ACTH. *J. Nucl. Biol. Med.* 13, 37-42
66. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. und RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
67. MANCINI, G., CARBONARA, A.O. und HEREMAN, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* 2, 235-254
68. GOLDSTEIN, G., SLYZYS, I.S. und CHASE, M.W. (1961) Studies on fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globuline. *J. Exp. Med.* 114, 89-94
69. HENNING, N. (1966) *Klinische Laboratoriumsdiagnostik*. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien

70. ANDREWS, P. (1965) The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* 96, 595-606
71. STEPANOV, V., KANDSCHUH, D. und ANDERER, F.A. (1978) Adsorption phenomena on Sephacryl S-200 superfine. *J. Chromatogr.* 147, 205-212
72. PETERSON, E.A. und SOBER, H.A. (1956) Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 751-755
73. JAMES, K. und STANWORTH, D.R. (1964) Studies on the chromatography of human serum proteins on diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose. I. The effect of the chemical and physical nature of the exchanger. *J. Chromatogr.* 15, 324-335
74. HJELM, H., HJELM, K. und SJÖQUIST, J. (1972) Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. *FEBS Lett.* 28, 73-76
75. TUCKER, I. (1978) Characterization of immune complexes in serum by adsorption on staphylococcal protein A: model studies and application to sera of rats bearing a Gross virus-induced lymphoma. *J. Immunol.* 121, 1644-1651
76. GOLDSTEIN, I.J., HOLLERMAN, C.E. und SMITH, E.E. (1965) Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concavalin A with polysaccharides. *Biochemistry* 4, 876-883
77. VAN ETEN, R.L. und SAINI, M.S. (1977) Preparation of homogeneous human prostatic acid phosphatase using concanavalin A-Sepharose 4B. *Biochim. Biophys. Acta* 484, 487-492

78. CLEMETSON, K.J., PFUELLER, S.J. und LUSCHER, E.F. (1977)
Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 464, 493-508
79. VRETBLAD, P. und HJORTH, R. (1977) The use of Wheat-germ Lectin-Sepharose for the purification of human haemopexin. *Biochem. J.* 167, 759-764
80. THOMPSON, S.T., CASS, K.H. und STELLWAGEN, E. (1975) Blue Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 669-672
81. BRUBAKER, P., BENNETT, H., BAIRD, A. und SOLOMAN, S. (1980)
Isolation of ACTH₁₋₃₉, ACTH₁₋₃₈, and CLIP from calf anterior pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1441-1448
82. LAEMMLI, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
83. GAZDAR, A.F., CARNEY, D.N., RUSSELL, E.K., SIMS, H.L., BAYLIN, S.B., BUNN, P.A., GUCCION, J.G. und MINNA, J.D. (1980)
Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of the lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res.* 40, 3502-3507
84. WOLFF, D.A. und PERTOFT, H. (1972) Separation of HeLa cells by colloidal silica density gradient centrifugation. *J. Cell Biol.* 55, 579-585
85. VON HOFF, D.D., WEISENTHAL, L.M., IHDE, D.C., MATHEWS, M.J., LAYARD, M. und MAKUCH, R. (1981) Growth of lung cancer colonies from bronchoscopy washings. *Cancer* 48, 400-403

86. PAVELIC, Z.P., SLOCUM, H.K., RUSTUM, Y.M., CREAVEN, P.J., NOWAK, N.J., KARAKOUSIS, C., TAKITA, H. und MITTELMAN, A. (1980) Growth of cell colonies in soft agar from biopsies of different human solid tumors. *Cancer Research* 40, 4151-4158
87. STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., CUCULIS, J.J. und MEYER, H.G. (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immuno-histochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 18, 315- 329
88. WEBER, K. und OSBORN, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412
89. NYDEGGER, U.E. (1979) Biological properties and detection of immune complexes in animal and human pathology. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 85, 63-123
90. LAMPSON, G.P. und TYTELL, A.A. (1965) A simple method for estimating isoelectric points. *Anal. Biochem.* 11, 374-377
91. STELLWAGEN, E. CASS, R. und THOMPSON, S.T. (1975) Predicted distribution of NAD domain among glycolytic enzymes. *Nature* 257, 716-717
92. EASTERDAY, R.L. und EASTERDAY, I. (1974) Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on Sephadex and Sepharose dye derivatives. In: *Immobilized biochemicals and affinity chromatography*. Ed: DUNLAP, R.B., Plenum Press, New York, 123-134
93. TRAVIS, J. und PANNELL, R. (1973) Selective removal of albumin from plasma by affinity chromatography. *Clin. Chim. Acta* 49, 49-52

94. GROPP,C., SOSSTMANN,H., LUSTER,W., KALBFLEISCH,H. und HAVEMANN,K. (1981) ACTH, β -Lipotropin, β -Endorphin, β -HCG, Calcitonin and CEA in lung tumor tissues. In: CEA und andere Tumormarker. Hsg.: UHLENBRUCK,G. und WINTZER,G., Tumor-Diagnostik-Verlag, Leonberg, 217-226
95. SALINAS,F.A., WEE,K.H. und SILVER,H.K.B. (1981) Immune complexes and human neoplasia. Detection and quantitation of circulating immune complexes by the fetal liver cell assay. Cancer Immunol. Immunother. 12,11-19
96. FÜST,G., PEKETE,B., ANGYAL,I., JAKAB,A., PAL,A., MERETÉY,K., FALUS,A., TÖRÖK,K., SZEGEDI,G., KAVAI,M., PUSKAS,E., CSECSI-NAGY,M., SZABO,T., LENKEY,A. und MISZ,M. (1981) Evaluation of different methods for detecting circulating immune complexes. Studies in patients with lung cancer. J. Immunol. Meth. 48, 259-276
97. ZUBLER,R.H., LANGE,G., LAMBERT,P.H. und MIESCHER,P.A. (1976) Detection of immune complexes in unheated sera by a modified ^{125}J -Clq binding test. J. Immunol. 116, 232-235
98. POLLARD,E.B., TIO,F., MYERS,J.W., CLARK,G.C., COLTMAN,C.A. und VON HOFF,D.D. (1981) Utilization of a human tumor cloning system to monitor for marrow involvement with small cell carcinoma of the lung. Cancer Research 41, 1015-1020
99. GADZDAR,A.F., CARNEY,D.N., SIMS,H.L. und SIMMONS,A. (1981) Heterotransplantation of small-cell carcinoma of the lung into nude mice: Comparison of intracranial and subcutaneous routes. Int. J. Cancer 28, 777-783
100. SHIMOSATO,Y., KAMEYA,T., NAGAI,K., HIROHASHI,S., KOIDE,T., HAYASHI,H. und NOMURA,T. (1976) Transplantation of human tumors into nude mice. J. nat. Cancer Inst. 56, 1251-1260

101. TAKAHASHI, M. (1981) Color Atlas of Cancer Cytology.
Thieme Verlag, Stuttgart/New York
102. MATTHEWS, M.J. (1980) Problems in morphology and behavior
of bronchopulmonary malignant disease. In: Lung
Cancer. Hsg.: ISRAEL, L., Academic Press, New York, 23-63
103. SORENSON, G.D., PETTENGILL, O.S., BRINCK-JOHNSEN, T.,
CATE, C.C. und MAURER, L.H. (1981) Hormone production
by cultures of small-cell carcinoma of the lung.
Cancer 47, 1289-1296
104. SCHURR, W., RAUE, F., MEYBIER, H. und ZIEGLER, R. (1982)
Die Bedeutung der radioimmunologischen Calcitoninbe-
stimmung beim C-Zellkarzinom. Lab. med. 6, 155-158
105. COOMBES, R.C., HILLYARD, C., GRENNBERG, F.B. und MCINTYRE,
I. (1974) Plasma immunoreactive calcitonin in patients
with non-thyroid tumors. Lancet 1, 1080-1083
106. MILHAUD, G., CALMETTE, C., TABOULET, J., JULIENNE, A. und
MOUKHTAR, M.S. (1974) Hypersecretion of calcitonin in
neoplastic conditions. Lancet 1, 462-463
107. HANSEN, M., HAMMER, M. und HUMMER, L. (1980) ACTH, ADH
and calcitonin concentrations as markers of response
and relapse in small cell carcinoma of the lung.
Cancer 46, 2062-2067
108. LIPS, C.J.M., VAN DER SLUYS VEER, J., VAN DER DONK, J.A.,
VAN DAM, R.H. and HACKENG, W.H.L. (1978) Common precursor
molecule as origin for the ectopic-hormone-producing-
tumor syndrome. Lancet 5, 16-18
109. JACOBS, J.W., LUND, P.K., POTTS, J.T., BELL, N.H. und
HABENER, J.F. (1981) Precalcitonin is a glycoprotein.
J. Biol. Chem. 256, 2803-2807

110. DESPLAN, C., BENICOURT, C., JULLIENNE, A., SEGOND, N.,
MOUKHTAR, M.S. und MILHAUD, G. (1980) Cell-free trans-
lation of m RNA coding for human and murine calcitonin.
FEBS Lett. 117, 89-92
111. ROOS, B.A., LINDALL, A.W., BAYLIN, S.B., O'NEIL, J.A.,
FRELINGER, A.L., BIRNBAUM, R.S. und LAMBERT, P.W. (1980)
Plasma immunoreactive calcitonin in lung cancer.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 50, 659-666
112. GOODMAN, R.H., JACOBS, J.W. und HABENER, J.F. (1979)
Cell-free translation of messenger RNA coding for a
precursor of human calcitonin. Biochem. Biophys. Res.
Commun. 91, 932-938
113. RATCLIFFE, J.G., PODMORE, J., STACK, B.H.R., SPILG, W.G.S.
und GROPP, C. (1982) Circulating ACTH and related pep-
tides in lung cancer. Br. J. Cancer 45, 230-236
114. YALOW, R.S. und BERSON, S.A. (1973) Characteristics of
"Big ACTH" in human plasma and pituitary extracts.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36, 415-423
115. GEWITZ, G. und YALOW, R.S. (1974) Ectopic ACTH production
in carcinoma of the lung. J. Clin. Invest. 53,
1022-1032
116. KRIEGER, D.T., LIOTTA, A.S., BROWNSTEIN, M.J. und ZIMMERMAN,
E.A. (1980) ACTH, β -lipotropin, and related peptides
in brain, pituitary, and blood. Rec. Prog. Horm. Res.
36, 277-334
117. ROSE, D.P. (1979) The ectopic production of hormones by
tumors. In: Endocrinology of Cancer. Hsg.: ROSE, D.P.,
CRC Press, Florida, 95-103

118. LAMBERTS, S.W.J., HACKENG, W.H.L. und VISSER, T.J. (1982)
Concomitant secretion of calcitonin, β -endorphin and
ACTH from medullary thyroid carcinoma in vivo and in
vitro. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18 253-260
119. SOFRONIEW, M.V., MADLER, M., MÜLLER, O.A. und SCRIBA, P.C.
(1978) A method for the consistent production of high
quality antisera to small peptide hormones. *Fresenius
Z. Anal. Chem.* 290, 163
120. MÜLLER, O.A., FINK, R., BAUR, X., EHBAUER, M., MADLER, M.
und SCRIBA, P.C. (1978) ACTH im Plasma: Extraktion und
Bestimmung. *Labor-Medizin Jg. 78*, 117-122
121. KOTLAR, H.K., SANNER, T., EKER, P., PIHL, A., ORJASÄTER, H.,
HARVEI, S., THEODORSEN, L. und JELLUM, E. (1982) Immune
anti-tumor response in the preclinical period of lung
cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18, 317-319
122. TARIN, D. und PRICE, J.E. (1979) Metastatic colonisation
potential of primary tumor cells in mice. *Br. J.
Cancer* 39, 740-754
123. KELLY, B.S., STREDULINSKY, U., HOEK, J.V. und LEVY, J.G.
(1981) Antibodies in the sera of patients with broncho-
genic carcinoma that react with antigen from a tumour
cell line. *Cancer Immunol. Immunother.* 12, 5-10
124. CRONIN, W.J., DORSETT, B.H. und Joachim, H.L. (1982)
Isolation of lung carcinoma-associated antibodies from
immune complexes and production of heterologous anti-
sera. *Cancer Research* 42, 292-300
125. HEIER, H.E., LANDAAS, T.O. und MARTON, P.F. (1979)
Circulating immune complexes and prognosis in human
malignant lymphoma. *Int. J. Cancer* 23, 292-298

126. MAIDMENT, B.W., PAPSIDERO, L.D., NEMOTO, T. und MING CHU, T. (1981) Recovery of immunologically reactive antibodies and antigens from breast cancer immune complexes by preparative isoelectric focusing. *Cancer Research* 41, 795-800
127. GROPP, C., LUSTER, W. und HAVEMANN, K. Autoimmunoreactive big-adrenocorticotropin synthesized by lung cancer tumor cells. *Verhandlungen der Deutschen Krebsgesellschaft (im Druck)*
128. MCGEE, J.O., WOODS, J.C., ASHALL, F., BRAMWELL, M.E. und HARRIS (1982) A new marker for human cancer cells. 2. Immunohistochemical detection of the Ca antigen in human tissues with the Cal antibody. *Lancet* 3, 1-11
129. PENG, W.W., BRESSLER, J.P., TIFFANY-CASTIGLIONI, E. und VELLIS, J. (1982) Development of a monoclonal antibody against a tumor-associated antigen. *SCIENCE* 215, 1102-1104
130. PETTENGILL, O.S. und SORENSON, G.D. (1981) Tissue culture and in vitro characteristics. In: Small cell lung cancer. Hsg.: GRECO, F.A., OLDHAM, R.K. und BUNN, P.A. Grune and Stratton, New York, 1-77
131. BRERETON, H.D., MATTHEWS, M.J. und COSTA, J. (1978) Mixed anaplastic small cell carcinoma of the lung. *Ann. Int. Med.* 88, 805-806
132. HÖRING, E., WÖRMANN, B., BÜCHNER, T. und MÜLLER, K.M. Heterogeneity of tumor cells in human bronchial carcinoma - histological and flow cytophotometrical analysis. *Verhandlungen der Deutschen Krebsgesellschaft (im Druck)*

133. ABELOFF, M.D., EGGLESTON, J.C. und MENDELSON, G. (1979) Changes in morphologic and biochemical characteristics of small cell carcinoma of the lung. *Am. J. Med.* 66, 757-764
134. ABELOFF, M.D. und EGGLESTON, J.C. (1981) Morphologic changes following therapy. In: *Small cell lung cancer*. Hsg.: GRECO, F.A., OLDHAM, R.K. und BUNN, P.A., Grune and Stratton, New York, 235-259
135. MATTHEWS, M.J. und HIRSCH, F.R. (1981) Problems in the diagnosis of small cell carcinoma of the lung. In: *Small cell lung cancer*. Hsg.: GRECO, F.A., OLDHAM, R.K. und BUNN, P.A., Grune and Stratton, New York, 35-51
136. PEARSE, A.G. (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *Cytochem.* 17, 303-313
137. GAZDAR, A.F., CARNEY, D.N., GUCCION, I.G. und BAYLIN, S.B. (1981) Small cell carcinoma of the lung: cellular origin and relationship to other pulmonary tumors. In: *Small cell lung cancer*. Hsg.: GRECO, F.A., OLDHAM, R.K. und BUNN, P.A., Grune and Stratton, New York, 145-176
138. STRAUS, M.J. und MORAN, R.E. (1981) The growth characteristics of lung cancer. In: *Lung cancer: Clinical diagnosis and treatment*. Hsg.: STRAUS, M.J., Grune and Stratton, New York, 105-134
139. RICHARDSON, R.L., GRECO, F.A., OLDHAM, R.K. und LIDDLE, G.W. (1978) Tumor products and potential markers in small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* 5, 253-262

140. ROBERTS, J.L., PHILLIPS, M., ROSA, P.A. und HERBERT, E.
(1978) Steps involved in the processing of common precursor forms of adrenocorticotropin and endorphin in cultures of mouse pituitary cells. *Biochemistry* 17, 3609-3618
141. HASKILL, S., KOREN, H., BECKER, S., FOWLER, W. und WALTON, L.
Mononuclear cell infiltration in ovarian cancer. III. Suppressor-cell and ADCC activity of macrophages from ascitic and solid ovarian tumours. *Br. J. Cancer* 45, 747-753
142. RUBIN, P., PROSS, H.F. und RÖDER, J.C. (1982) Studies of human natural killer cells. *J. Immunol.* 128, 2553-2558
143. KENNEL, S.J., FOOTE, L.J. und LANKFORD, P.K. (1981) Analysis of surface proteins of mouse lung carcinomas using monoclonal antibodies. *Cancer Research* 41, 3465-3470
144. MILSTEIN, C. (1982) Monoclonal antibodies. *Cancer* 49, 1953-1957
145. GROPP, C., HAVEMANN, K., LUSTER, W. und LEHMANN, F.G.
(1980) Carcinoembryonic antigen as parameter for staging and monitoring of therapy in patients with lung cancer. In: CEA und andere Tumormarker. Hsg.: UHLENBRUCK, G. und WINTZER, G., Tumor-Diagnostik Verlag, Leonberg, 198-209
146. BONIKOS, D.S. und BENSCH, K.G. (1977) Endocrine cells of bronchial and bronchiolar epithelium. *Am.J. Med.* 63, 765-771

LEBENS LAUF

- 3.2.1950 geboren als Sohn von Elise und Gerhard Luster in Berlin
- 1957-1963 Besuch der Volksschule in Berlin 13
- 1963-1966 Heinrich-Hertz Hauptschule in Berlin 13
- 1966-1969 Lehre als Werkzeugmacher bei der Siemens AG in Berlin 13
- 1970-1973 Besuch einer Abendschule zur Vorbereitung auf die Reifeprüfung in Berlin
- Juni 1973 Reifeprüfung
- 1973-1979 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
- Okt. 1976 Diplom-Vorexamen
- April 1978 mündlicher Teil der Diplom-Hauptprüfung
- Mai 1978- experimentelle Diplomarbeit über das Thema
März 1979 "Untersuchungen zum Abbau ungesättigter Fettsäuren unter Beteiligung einer 4-Enoyl-CoA-Reduktase in Escherichia coli" in der Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
- März 1979- Weiterarbeit als wiss. Hilfskraft an der Thematik
Nov. 1979 der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe für Bioorganische Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
- 1980-1983 wissenschaftlicher Assistent im DFG-Projekt Gr 564 in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universität Marburg
- Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit im Rahmen dieser Tätigkeit

DANKSAGUNGEN

Für das Zustandekommen der vorliegenden Arbeit bin ich zu besonderem Dank verpflichtet:

Herrn Prof.Dr. L.M.G. Heilmeyer, jr., für die Begutachtung der Arbeit und hilfreiche Diskussionen

Herrn Prof.Dr. A. Ruthmann für die Übernahme des Korreferates

Herrn PD Dr. C. Gropp für das Überlassen des Themas und die gute Zusammenarbeit

Herrn Prof.Dr. K. Havemann für seine ständige Diskussionsbereitschaft

den Herren Dr. G. Dickneite, Dr. K. Bosslet, Behringwerke, Marburg und Dr.R. Korsgaard, Lund, Schweden für die Zusammenarbeit beim Etablieren von Tumoren auf immuninkompetenten Nagetieren

den Mitarbeitern der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universität Marburg, insbesondere Frau D. Kahmann, Frau C. Loechelt und Frau B. Rohleder, für ihre praktische Unterstützung

